

**COMPOSICIONES DE PORTADOR-ANTICUERPO Y MÉTODOS PARA
REALIZARLAS Y UTILIZARLAS**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de
presentación de la solicitud de patente provisional
estadounidense N.º 62/060.484, presentada el 6 de octubre de
2014; y la solicitud de patente provisional estadounidense
N.º 62/206.770; 62/206.771; y 62/206.772 presentadas el 18 de
10 agosto de 2015. Las patentes anteriores se incorporan en su
totalidad mediante esta referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente descripción se refiere a composiciones novedosas
15 de anticuerpos y proteínas portadoras y métodos para
realizarlas y utilizarlas, en particular, como un agente
terapéutico contra el cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA

20 La quimioterapia sigue siendo un pilar de la terapia
sistémica para muchos tipos de cáncer, incluso melanoma. La
mayoría de los quimioterapéuticos solo son levemente
selectivos para células tumorales y la toxicidad para células
proliferativas sanas puede ser alta (Allen TM. (2002) *Cancer*

2:750-763), lo que a menudo requiere una reducción de la dosis e incluso la interrupción del tratamiento. En teoría, una forma de superar los problemas de toxicidad en la quimioterapia así como mejorar la eficacia de los fármacos es
5 dirigir el fármaco de quimioterapia hacia el tumor utilizando anticuerpos que son específicos para proteínas expresadas (o sobreexpresadas) selectivamente por células tumorales para atraer los fármacos dirigidos hacia el tumor, alterando así la biodistribución de la quimioterapia y provocando que vaya
10 más fármaco hacia el tumor y que afecte menos el tejido sano. Sin embargo, a pesar de 30 años de investigación, el direccionamiento específico rara vez tiene éxito en el contexto terapéutico.

La quimioterapia dependiente de anticuerpo (ADC) convencional
15 está diseñada con un agente tóxico unido a un anticuerpo dirigido mediante un enlazador escindible por proteasa sintético. La eficacia de dicha terapia ADC depende de la capacidad de la célula diana de unirse al anticuerpo, el enlazador que se escinde y la absorción del agente tóxico en
20 la célula diana. Schrama, D. et al. (2006) *Nature reviews. Drug discovery* 5:147-159.

La quimioterapia dirigida con anticuerpos prometió ventajas sobre la terapia convencional ya que proporciona combinaciones de capacidad de direccionamiento, múltiples

agentes citotóxicos y mejor capacidad terapéutica con potencialmente menos toxicidad. A pesar de la extensa investigación, la quimioterapia dirigida con anticuerpos clínicamente eficaz sigue siendo difícil: los principales
5 obstáculos incluyen la inestabilidad de los enlazadores entre el anticuerpo y el fármaco de quimioterapia, la toxicidad tumoral reducida del agente quimioterapéutico cuando se une al anticuerpo y la incapacidad del conjugado de unirse e ingresar a las células tumorales. Además, estas terapias no
10 permitían el control sobre el tamaño de los conjugados de anticuerpo-fármaco.

En la técnica sigue existiendo la necesidad de agentes terapéuticos de cáncer basados en anticuerpo que mantengan el efecto citotóxico para la administración de fármaco dirigida
15 para proporcionar una eficacia antitumoral confiable y mejorada sobre los agentes terapéuticos anteriores.

Además, en cuanto a cualquier aplicación terapéutica, también sigue existiendo la necesidad de que la composición sea estable en sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

20 La liofilización elimina agua de una composición. En el proceso, el material que se seca primero se congela y luego se elimina el hielo o el disolvente congelado por sublimación en un ambiente de vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones preliofilizadas para mejorar la estabilidad

durante el proceso de liofilización y/o para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento. Pikal, M. *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) y Arakawa *et al.*, *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991).

5 Aunque las proteínas se pueden liofilizar, el proceso de liofilización y reconstitución puede afectar las propiedades de la proteína. Debido a que las proteínas son más grandes y más complejas que los fármacos tradicionales orgánicos e inorgánicos (es decir, poseen múltiples grupos funcionales
10 además de estructuras tridimensionales complejas), la formulación de tales proteínas plantea problemas especiales. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, una formulación puede preservar intacta la integridad conformacional de al menos una secuencia nuclear de los
15 aminoácidos de la proteína y al mismo tiempo proteger a los múltiples grupos funcionales de la proteína de la degradación. Las vías de degradación para las proteínas pueden implicar inestabilidad química (es decir, cualquier proceso que implique modificación de la proteína mediante la
20 formación o escisión de enlace, lo que da como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química puede ser el resultado de la desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, beta

eliminación o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede ser el resultado de la desnaturalización, agregación, precipitación o absorción, por ejemplo. Las tres vías de degradación de proteínas más comunes son agregación, desamidación y oxidación de proteínas. Cleland, et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10(4): 307-377 (1993).

En la presente invención, la composición comprende nanopartículas que contienen (a) proteína portadora (b) anticuerpo y (c) opcionalmente un agente terapéutico. Se cree que el anticuerpo se une a la proteína portadora a través de interacciones hidrofóbicas que, por su naturaleza, son débiles. La liofilización y reconstitución de dicha composición, por lo tanto, no solo debe conservar la actividad de los componentes individuales, sino también su relación relativa en la nanopartícula.

Otros desafíos se imponen debido a que las nanopartículas se utilizan en terapia.

Por ejemplo, la reorganización de los componentes hidrofóbicos en la nanopartícula se puede mitigar a través de enlaces covalentes entre los componentes. Sin embargo, dichos enlaces covalentes plantean desafíos para el uso terapéutico de nanopartículas en tratamiento de cáncer. En anticuerpo, la proteína portadora y el agente terapéutico adicional

normalmente actúan en diferentes ubicaciones en un tumor y a través de diferentes mecanismos. Los enlaces no covalentes permiten que los componentes de la nanopartícula se disocien en el tumor. Por ende, aunque un enlace covalente puede ser
5 ventajoso para la liofilización, puede ser desventajoso para el uso terapéutico.

El tamaño de las nanopartículas, y la distribución del tamaño, también es importante. Las nanopartículas de la invención se pueden comportar de modo diferente de acuerdo
10 con su tamaño. En tamaños grandes, las nanopartículas o la aglomeración de estas partículas pueden bloquear los vasos sanguíneos, cualquiera de los cuales puede afectar el rendimiento y la seguridad de la composición.

Finalmente, los crioprotectores y agentes que ayudan en el
15 proceso de liofilización pueden ser seguros y tolerados para el uso terapéutico.

COMPENDIO

En un aspecto, en la presente se proporcionan composiciones
20 de nanopartículas que comprenden nanopartículas en donde cada una de las nanopartículas comprende una proteína portadora, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 anticuerpos, y opcionalmente al menos un agente terapéutico, en donde los anticuerpos están dispuestos hacia afuera desde la superficie

de las nanopartículas y en donde las nanopartículas pueden unirse a un epítipo predeterminado *in vivo*.

Cuando se administran por vía intravenosa, las partículas grandes (p. ej. superiores a 1 μm) normalmente son
5 desfavorecidas debido a que pueden quedar atrapadas en la microvasculatura de los pulmones. Al mismo tiempo, las partículas grandes se pueden acumular en el tumor u órganos específicos. Véase, p. ej., la partícula de vidrio de 20-60 micrones que se utiliza para inyectar en la arteria hepática
10 que alimenta un tumor del hígado, denominada "therasphere" (en uso clínico para cáncer de hígado).

Por ende, para la administración intravenosa, se utilizan partículas inferiores a 1 μm . Las partículas superiores a 1 μm , más típicamente, se administran directamente en un
15 tumor ("inyección directa") o en una arteria que alimenta que se alimenta en el sitio del tumor.

En otro aspecto, en la presente se proporcionan composiciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas en donde cada una de las nanopartículas comprende una proteína portadora
20 que no es albúmina, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 100 anticuerpos, preferentemente entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos, y opcionalmente al menos un agente terapéutico, en donde los anticuerpos están dispuestos en una superficie exterior de

las nanopartículas y en donde las nanopartículas pueden unirse a un epítipo predeterminado *in vivo*. Cuando las nanopartículas se multimerizan, la cantidad de anticuerpos aumenta proporcionalmente. Por ejemplo, si una nanopartícula de 160 nm contiene 400 anticuerpos, un dímero de 320 nm contiene aproximadamente 800 anticuerpos.

En otro aspecto, en la presente se proporcionan composiciones de nanopartículas que comprenden nanopartículas en donde cada una de las nanopartículas comprende una proteína portadora, entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos, y opcionalmente al menos un agente terapéutico que no es paclitaxel, en donde los anticuerpos están dispuestos en una superficie de las nanopartículas de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie y en donde las nanopartículas pueden unirse a un epítipo predeterminado *in vivo*.

En otras modalidades, las nanopartículas se multimerizan, p. ej. se dimerizan. La multimerización se puede observar como múltiplos del peso o tamaño de la molécula unitaria, p. ej. las partículas de 160 nm se multimerizan a aproximadamente 320 nm, 480 nm, 640 nm, etc. En algunas modalidades, menos del 20 % de la población son multímeros. En algunas modalidades, más del 80% de la población son multímeros.

En una modalidad, la proporción en peso de fármaco unido al

portador a anticuerpo (p. ej. paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab) es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:1. En una modalidad, la proporción en peso de fármaco unido a portador a anticuerpo es de

5 aproximadamente 10:4. En una modalidad, el anticuerpo es una capa sustancialmente simple de anticuerpos en toda o en parte de la superficie de la nanopartícula. En una modalidad, menos del 0,01 % de las nanopartículas en la composición tienen un tamaño seleccionado del grupo que consiste en más de 200 nm,

10 más de 300 nm, más de 400 nm, más de 500 nm, más de 600 nm, más de 700 nm y más de 800 nm. Se cree que los tamaños más grandes son el resultado de la multimerización de varias nanopartículas, cada una de las cuales comprende un núcleo y recubrimiento de anticuerpo en toda o en parte de la

15 superficie de cada nanopartícula. .

La invención además incluye composiciones liofilizadas y composiciones liofilizadas que no difieren materialmente de, o son las mismas que, las propiedades de nanopartículas recién preparadas. En particular, la composición liofilizada,

20 tras volver a suspenderse en solución acuosa, es similar o idéntica a la composición nueva en términos de tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula, toxicidad para células de cáncer, afinidad de anticuerpo y especificidad de anticuerpo. La invención se refiere al

hallazgo sorprendente de que las nanopartículas liofilizadas mantienen las propiedades de nanopartículas recién hechas a pesar de la presencia de dos componentes proteicos diferentes en estas partículas.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición de nanopartícula liofilizada que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas comprende un núcleo de fármaco unido a portador y una cantidad de anticuerpo dispuesto en una superficie del núcleo
10 de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie, en donde los anticuerpos mantienen su asociación con la superficie exterior de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa. En una modalidad, la composición liofilizada
15 es estable a temperatura ambiente durante al menos 3 meses. En una modalidad, las nanopartículas reconstituidas mantienen la actividad del agente terapéutico y son capaces de unirse al objetivo *in vivo*.

En una modalidad, el tamaño de nanopartícula reconstituida
20 promedio es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 1 μ m. En una modalidad preferida, el tamaño de nanopartícula reconstituida promedio es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 200 nm, y más preferentemente de aproximadamente 160 nm. En una modalidad, el tamaño de

nanopartícula reconstituida promedio es de más de aproximadamente 800 nm a aproximadamente 3,5 μ m, con multímeros de nanopartículas más pequeñas, p. ej. multímeros de nanopartículas de 100-200 nm. En una modalidad, la
5 proporción en peso de núcleo a anticuerpo es de más de 1:1 a aproximadamente 1:3.

En un aspecto, la presente descripción se refiere a una composición de nanopartícula liofilizada que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas
10 comprende: (a) un núcleo de paclitaxel unido a albúmina y (b) entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 moléculas de bevacizumab dispuestas en una superficie del núcleo de paclitaxel unido a albúmina de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa
15 superficie, en donde los anticuerpos mantienen su asociación con la superficie de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa, siempre que dicha composición liofilizada sea estable entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C durante al menos 3 meses y las
20 nanopartículas reconstituidas sean capaces de unirse a VEGF *in vivo*.

En otros aspectos, la presente descripción se refiere a una composición de nanopartícula liofilizada que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas

comprende: (a) un núcleo de paclitaxel unido a albúmina y (b) una cantidad de bevacizumab dispuesta en una superficie del núcleo de paclitaxel unido a albúmina de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie, en donde los anticuerpos mantienen su asociación con la superficie de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa, siempre que dicha composición liofilizada sea estable entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C durante al menos 3 meses y las nanopartículas reconstituidas sean capaces de unirse a VEGF *in vivo*, y en donde además el tamaño de nanopartícula reconstituida promedio no es sustancialmente diferente del tamaño de partícula de las nanopartículas recién preparadas. En algunas modalidades, los tamaños de partícula son entre 200 y 800 nm, incluso 200, 300, 400, 500, 600, 700 o 800 nm. En otras modalidades, las partículas son más grandes, p. ej. entre más de 800 nm y aproximadamente 3,5 µm. En algunas modalidades, las partículas son multímeros de nanopartículas. En algunas modalidades, la proporción en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:1. En otras modalidades, la proporción en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab es de aproximadamente 10:4. En modalidades adicionales, la proporción en peso de paclitaxel unido a

albúmina a bevacizumab es de entre más de 1:1 y aproximadamente 1:3.

En algunas modalidades, el núcleo es paclitaxel unido a albúmina y los anticuerpos se seleccionan de anticuerpos que
5 reconocen selectivamente VEGF (p. ej. bevacizumab/Avastin), anticuerpos que reconocen selectivamente CD20 (p. ej. rituximab/Rituxin) y anticuerpos que reconocen selectiva Her2 (Trastuzumab/Herceptin).

En algunas modalidades, el al menos un agente terapéutico
10 está ubicado dentro de la nanopartícula. En otras modalidades, el al menos un agente terapéutico está ubicado en la superficie exterior de la nanopartícula. En aun otras modalidades, el al menos un agente terapéutico está ubicado dentro de la nanopartícula y en la superficie exterior de la
15 nanopartícula.

En algunas modalidades, la nanopartícula contiene más de un tipo de agente terapéutico. Por ejemplo, un fármaco de taxano y de platino, p. ej. paclitaxel y cisplatino.

En algunas modalidades, los anticuerpos se seleccionan del
20 grupo que consiste en ado-trastuzumab emtansina, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, denosumab, dinutuximab, ipilimumab, nivolumab, obinutuzumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, rituximab y trastuzumab. En algunas modalidades, los anticuerpos son una capa

sustancialmente simple de anticuerpos en toda o en parte de la superficie de la nanopartícula.

En modalidades adicionales, los anticuerpos están menos glicosilados de lo que se encuentra normalmente en anticuerpos humanos naturales. Dicha glicosilación puede ser influenciada por, p. ej., el sistema de expresión o la presencia de inhibidores de glicosilación durante la expresión. En algunas modalidades, el estado de glicosilación de un anticuerpo se altera a través de una acción enzimática o química.

En algunas modalidades, el al menos un agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en abiraterona, bendamustina, bortezomib, carboplatino, cabazitaxel, cisplatino, clorambucilo, dasatinib, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etopósido, everolimus, gefitinib, idarubicina, imatinib, hidroxiurea, imatinib, lapatinib, leuprorelina, melfalán, metotrexato, mitoxantrona, nedaplatino, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, pazopanib, pemetrexed, picoplatino, romidepsina, satraplatino, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, tenipósido, triplatino, vinblastina, vinorelbina, vincristina y ciclofosfamida.

En algunas modalidades, la nanopartícula además comprende al menos un agente terapéutico adicional que no es paclitaxel o bevacizumab.

En algunas modalidades, los anticuerpos, la proteína portadora y, cuando está presente, el agente terapéutico, se unen a través de enlaces no covalentes.

En algunas modalidades, la proteína portadora se selecciona
5 del grupo que consiste en gelatina, elastina, gliadina, legúmina, zeína, una proteína de soja, una proteína de leche y una proteína de suero. En otras modalidades, la proteína portadora es albúmina, por ejemplo, albúmina de suero humano.

En algunas modalidades, la composición se formula para
10 administración intravenosa. En otras modalidades, la composición se formula para inyección directa o perfusión en un tumor.

En algunas modalidades, el tamaño de nanopartícula promedio en la composición es de entre más de 800 nm y aproximadamente
15 3,5 μm .

En algunas modalidades, las nanopartículas tienen una constante de disociación de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 1×10^{-9} M.

En otro aspecto, en la presente se proporcionan métodos para
20 realizar composiciones de nanopartícula, en donde dichos métodos comprenden poner en contacto la proteína portadora y opcionalmente el al menos un agente terapéutico con los anticuerpos en una solución que tiene un pH de entre 5,0 y 7,5 y una temperatura de entre aproximadamente 5 °C y

aproximadamente 60 °C, entre aproximadamente 23 °C y
aproximadamente 60 °C, o entre aproximadamente 55 °C y
aproximadamente 60 °C en condiciones y proporciones de
componentes que permiten la formación de las nanopartículas
5 deseadas. En una modalidad, la nanopartícula se hace a 55-
60 °C y pH 7,0. En otro aspecto, en la presente se
proporcionan métodos para realizar las composiciones de
nanopartícula, en donde dichos método comprende (a) poner en
contacto la proteína portadora y opcionalmente el al menos un
10 agente terapéutico para formar un núcleo y (b) poner en
contacto el núcleo con los anticuerpos en una solución que
tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente
7,5 a una temperatura de entre aproximadamente 5 °C y
aproximadamente 60 °C, entre aproximadamente 23 °C y
15 aproximadamente 60 °C, o entre aproximadamente 55 °C y
aproximadamente 60 °C en condiciones y proporciones de
componentes que permiten la formación de las nanopartículas
deseadas.

La cantidad de componentes (p. ej., la proteína portadora,
20 los anticuerpos, los agentes terapéuticos, y combinaciones de
estos) se controla para proporcionar la formación de las
nanopartículas deseadas. Una composición en donde la cantidad
de componentes es demasiado diluida para formar las
nanopartículas como se desea en la presente. En una modalidad

preferida, la proporción en peso de la proteína portadora a anticuerpo es de 10:4. En algunas modalidades, la cantidad de proteína portadora es de entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 100 mg/mL. En algunas modalidades, la cantidad de anticuerpo es de entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 30 mg/mL. Por ejemplo, en algunas modalidades, la proporción de proteína portadora:anticuerpo:solución es de aproximadamente 9 mg de proteína portadora (p. ej., albúmina) a 4 mg de anticuerpo (p. ej., BEV) en 1 mL de solución (p. ej., salina). Una cantidad de agente terapéutico (p. ej., taxol) también se puede agregar a la proteína portadora.

En modalidades adicionales, las nanopartículas se hacen como anteriormente, y luego se liofilizan.

En otro aspecto, en la presente se proporcionan métodos para tratar una célula de cáncer, el cual método comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una composición de nanopartícula descrita en la presente para tratar la célula de cáncer.

En otro aspecto, en la presente se proporcionan métodos para tratar un tumor en un paciente que lo necesita, el cual método comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de una composición de nanopartícula descrita en la presente para tratar el tumor. En algunas modalidades, el

tamaño del tumor se reduce. En otras modalidades, la composición de nanopartícula se administra por vía intravenosa. En aun otras modalidades, la composición de nanopartícula se administra por inyección directa o perfusión en el tumor.

En algunas modalidades, los métodos proporcionados en la presente incluyen las siguientes etapas: a) administrar la composición de nanopartícula una vez por semana durante tres semanas; b) detener la administración de la composición de nanopartícula durante una semana; y c) repetir las etapas a) y b) según sea necesario para tratar el tumor.

En modalidades relacionadas, el tratamiento comprende la administración del anticuerpo de direccionamiento antes de la administración de las nanopartículas. En una modalidad, el anticuerpo de direccionamiento se administra entre aproximadamente 6 y 48, o entre 12 y 48 horas antes de la administración de las nanopartículas. En otra modalidad, el anticuerpo de direccionamiento se administra entre 6 y 12 horas antes de la administración de las nanopartículas. En aun otra modalidad, el anticuerpo de direccionamiento se administra entre 2 y 8 horas antes de la administración de las nanopartículas. En aun otras modalidades, el anticuerpo de direccionamiento se administra una semana antes de la administración de las nanopartículas. Por ejemplo, la

administración de una dosis de BEV 24 horas antes de la administración de AB160. En otro ejemplo, antes de la administración de rituximab antes de la administración de las nanopartículas AR. El anticuerpo administrado antes de la
5 nanopartícula se puede administrar como una dosis subterapéutica, por ejemplo 1/2, 1/10° o 1/20 la cantidad normalmente considerada terapéutica. Por ende, en hombre, el pretratamiento con BEV puede comprender la administración de 1 mg/kg de BEV que es 1/10° la dosis usual, seguido de la
10 administración de AB160.

En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 75 mg/m² y aproximadamente 175 mg/m² de la proteína portadora (es decir, proteína portadora en miligramos por m² de paciente). En otras
15 modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 75 mg/m² y aproximadamente 175 mg/m² del agente terapéutico (p. ej., paclitaxel). En otras modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 30 mg/m² y aproximadamente 70 mg/m² del
20 anticuerpo. En aun otras modalidades, la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 30 mg/m² y aproximadamente 70 mg/m² de bevacizumab.

En una modalidad específica, la composición liofilizada comprende entre aproximadamente 75 mg/m² y aproximadamente

175 mg/m² de la proteína portadora que es preferentemente albúmina; entre aproximadamente 30 mg/m² y aproximadamente 70 mg/m² del anticuerpo que es preferentemente bevacizumab; y entre aproximadamente 75 mg/m² y aproximadamente 175 mg/m² de paclitaxel.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las siguientes figuras son solo representativas de la invención y no pretenden ser una limitación. Por razones de consistencia, las nanopartículas de la presente invención que utilizan Abraxane® y bevacizumab emplean el acrónimo "AB" y el número después de AB tal como AB160 confiere el tamaño de partícula promedio de estas nanopartículas (en nanómetros). Asimismo, cuando el anticuerpo es rituximab, la cantidad es "AR" mientras que el número después de este permanece igual.

La figura 1A muestra diagramas de dispersión de citometría de flujo que incluyen: Abraxane® (ABX - disponible comercialmente en Celgene Corporation, Summit, NJ 07901) teñido solo con anticuerpo secundario (panel superior izquierdo), ABX teñido con Fab de IgG1 antiratón de cabra más anticuerpo secundario (panel superior derecho), AB160 (que es una nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab en una proporción de aproximadamente 10:4 y tienen un tamaño de partícula promedio de 160 nm) teñido solo

con anticuerpo secundario (panel inferior izquierdo), o AB160 teñido con Fab de IgG1 antiratón de cabra más anticuerpo secundario (panel inferior derecho).

La figura 1B muestra una micrografía electrónica
5 representativa después de la incubación de AB160 con Fc de IgG antihumano etiquetado con partícula de oro.

La figura 1C muestra un gráfico circular (arriba) que indica los porcentajes de paclitaxel total en fracciones de AB160 (particulado, proteínas superiores a 100 kD y proteínas
10 inferiores a 100 kD); y una transferencia Western con anticuerpos contra Fab de IgG de ratón (BEV) y paclitaxel para verificar la colocalización (abajo).

La figura 1D representa la actividad de paclitaxel en un ensayo de toxicidad *in vitro* con células de melanoma humano
15 A375, en comparación con ABX solo. Los resultados están representados por el índice de proliferación promedio (+/- SEM), que es el porcentaje de proliferación total de células no tratadas. Estos datos representan 3 experimentos y las diferencias no fueron significativas.

20 La figura 1E representa los resultados de un ELISA de VEGF de sobrenadante después de la coincubación de VEGF con ABX y AB160 para determinar la unión del ligando, VEGF, por el anticuerpo. Los resultados se muestran como el porcentaje promedio +/- SEM de VEGF uno unido por los 2 complejos. Los

datos representan 3 experimentos ** $P < 0,005$.

La figura 2A muestra el tamaño de los complejos (determinado por tecnología de dispersión de luz) formados por adición de BEV (bevacizumab) a ABX en condiciones donde se forman nanopartículas y mayores. Se agregaron concentraciones crecientes de BEV (0-25 mg) a 10 mg de ABX y se determinó el tamaño de los complejos formados. El tamaño promedio de los complejos (entre 146 nm y 2.166 nm) aumentó a medida que la concentración de BEV aumentaba. Los datos se visualizan como volumen de muestra/tamaño y las gráficas muestran la distribución de tamaño de las partículas. Estos datos son representativos de 5 preparaciones de fármaco separadas. Como comparación, ABX, por sí mismo, tiene un tamaño de partícula promedio de aproximadamente 130 nm.

La figura 2B muestra la afinidad de la unión de ABX y BEV (según lo determinado por tecnología de absorción de luz (BLItz)). Los datos se visualizan como constante de disociación (K_d). Se evaluó la afinidad de unión de las partículas hechas en cuatro niveles de pH (3, 5, 7, 9) y 3 temperaturas (RT, 37 °C y 58 °C), y los datos son representativos de 5 experimentos.

La figura 2C muestra la estabilidad de los complejos de nanopartículas de la figura 2B en suero según lo determinado por un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) en

Nanosight 300 (NS300). Los datos se visualizan como la cantidad de partículas/mg de ABX y comparan AB160 preparada a TA y pH 7 (AB16007; tamaño de partícula, pH), 58 °C y pH 7 (AB1600758; tamaño de partícula, pH, temperatura) y 58 °C y pH 5 (AB1600558; tamaño de partícula, pH, temperatura), con respecto a ABX solo en cada condición. Una vez preparadas las partículas, se agregaron a suero AB humano durante 15, 30 y 60 minutos para determinar la estabilidad en suero a través del tiempo.

La figura 3A muestra la evaluación *in vivo* de nanopartículas AB en ratones lampiños atímicos inyectados con 1×10^6 A375 células de melanoma humano en el flanco derecho y tratados con PBS, 12 mg/kg de BEV, 30 mg/kg de ABX, 12 mg/kg de BEV + 30 mg/kg de ABX, o AB160 (con aproximadamente 12 mg/kg de BEV y aproximadamente 30 mg/kg de ABX) en tamaño de tumor entre aproximadamente 600 mm³ y 900 mm³. Los datos se representan en el 7 después del tratamiento como el cambio porcentual en el tamaño de tumor desde el inicio (el tamaño del tumor el día de tratamiento). Se utilizó la prueba t de Student para determinar la significancia. Los valores p para las partículas AB fueron todos significativamente diferentes de PBS, los fármacos individuales solos y los 2 fármacos proporcionados secuencialmente.

La figura 3B muestra las curvas de Kaplan-Meier generadas

para la supervivencia media de los ratones analizados en la figura 3A. Se determinó la significancia utilizando la prueba de Mantle-Cox que compara las curvas de supervivencia.

La figura 3C muestra el cambio porcentual desde el inicio para ratones tratados cuando los tumores eran menores o mayores a 700 mm³, para determinar si el tamaño del tumor afectaba la respuesta del tumor para ABX solo y grupos de AB160. Se utilizó la prueba t de Student para determinar la significancia; los grupos de ABX solos no mostraron ninguna diferencia significativa ($p = 0,752$) en base al tamaño del tumor, mientras que los grupos de AB160 eran significativamente diferentes ($p = 0,0057$).

La figura 3D muestra la evaluación *in vivo* de nanopartículas AB en ratones lampiños atímicos inyectados con 1×10^6 A375 células de melanoma humano en el flanco derecho y tratados con PBS, 30 mg/kg de ABX o 45 mg/kg de BEV y AB160, AB580 (nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina con bevacizumab que tiene un tamaño de partícula promedio de 580 nm) o AB1130 (nanopartícula de paclitaxel unido a albúmina con bevacizumab que tiene un tamaño de partícula promedio de 1130 nm) en un tamaño de tumor de entre aproximadamente 600 mm³ y 900 mm³. Los datos se representan en el 7 después del tratamiento como el cambio porcentual en el tamaño de tumor desde el inicio (el tamaño del tumor el día de tratamiento). Se utilizó la

prueba t de Student para determinar la significancia. Los valores p para las partículas AB fueron todos significativamente diferentes de PBS, los fármacos individuales solos y los 2 fármacos proporcionados
5 secuencialmente. La diferencia entre las partículas AB de diferentes tamaños no fue significativa.

La figura 3E muestra las curvas de Kaplan-Meier generadas para la supervivencia media de los ratones analizados en la figura 3D. Se determinó la significancia utilizando la prueba
10 de Mantle-Cox que compara las curvas de supervivencia.

La figura 4A demuestra la concentración de paclitaxel en sangre presentada en gráfica de líneas con el eje y a escala logarítmica, en base a muestras de sangre y tumor tomadas de ratones que no presentan tumores y ratones que presentan
15 tumores a las 0-24 horas después de la inyección IV con 30 mg/kg de paclitaxel en el contexto de ABX o AB160 y medida mediante LC-MS. Los ratones fueron inyectados IV en el tiempo 0, con las muestras de sangre tomadas, y los ratones fueron sacrificados en los puntos temporales de 0, 4, 8, 12 y 24
20 horas. Había al menos 3 ratones por tiempo temporal. Se utilizó la prueba t de Student para determinar si alguna diferencia en las concentraciones entre ABX y AB160 era significativa.

La figura 4B demuestra la concentración de paclitaxel en

sangre de la figura 4A, presentada en gráfica de líneas con el eje y a escala numérica.

La figura 4C muestra los valores de $C_{\text{máx}}$, semivida y AUC calculados a partir de los datos de concentración en sangre
5 proporcionados en las figuras 4A y 4B.

La figura 4D demuestra la concentración de paclitaxel en sangre presentada en gráfica de líneas con el eje y a escala logarítmica de un segundo experimento farmacocinético que utiliza puntos temporales más tempranos (entre 2 y 8 horas).

10 La figura 4E demuestra la concentración de paclitaxel en sangre de la figura 4D, presentada en gráfica de líneas con el eje y a escala numérica.

La figura 4F muestra la concentración de paclitaxel en sangre en ratones en los cuales los tumores se dejaron crecer hasta
15 un tamaño más grande antes de las inyecciones de ABX y AB160.

La figura 4G muestra $C_{\text{máx}}$ y AUC calculados a partir de los datos en la figura 4F.

La figura 4H muestra las concentraciones de paclitaxel en los tumores del segundo experimento con ratón según lo
20 determinado mediante LC-MS. Los datos se presentan como μg de paclitaxel/mg de tejido tumoral. Se utilizó la prueba t de Student para determinar si las diferencias eran significativas.

La figura 4I muestra los niveles de radiactividad de I-125 en

ratones tratados con AB160 con respecto a ABX solo.

La figura 4J muestra una representación gráfica de los niveles de radioactividad de I-125 que se muestra en la figura 4I.

- 5 La figura 5A muestra las mediciones de tamaños de partícula y la afinidad de las nanopartículas hechas con rituximab. Se incubó 10 mg/ml de ABX con rituximab (RIT) en 0-10 mg/ml y se utilizó tecnología de dispersión de luz (Mastersizer 2000) para determinar los tamaños de partícula resultantes. Los
- 10 datos se representan como el porcentaje de volumen de partículas en cada tamaño y las curvas representan las distribuciones de tamaños de partícula (arriba). La tabla (abajo) muestra los tamaños de las partículas resultantes en cada concentración de anticuerpo.
- 15 La figura 5B muestra las mediciones de tamaños de partícula y la afinidad de las nanopartículas hechas con trastuzumab. Se incubó 10 mg/ml de ABX con trastuzumab (HER) en 0-22 mg/ml y se utilizó tecnología de dispersión de luz (Mastersizer 2000) para determinar los tamaños de partícula resultantes. Los
- 20 datos se representan como el porcentaje de volumen de partículas en cada tamaño y las curvas representan las distribuciones de tamaños de partícula (arriba). La tabla (abajo) muestra los tamaños de las partículas resultantes en cada concentración de anticuerpo.

La figura 5C muestra la afinidad de unión de rituximab y trastuzumab en comparación con ABX en pH 3, 5, 7 y 9, determinada mediante tecnología de interferometría de biocapa (BLItz). Las constantes de disociación se representan para
5 cada interacción.

La figura 6A muestra la toxicidad *in vitro* de AR160 según lo evaluado con la línea celular de linfoma humano Daudi positiva de CD20. Los datos se representan en una gráfica del índice de proliferación, que es el porcentaje de células
10 positivas de FITC en pocillos tratados con respecto a células positivas de FITC en el pocillo sin tratar (el mayor nivel de proliferación).

La figura 6B muestra la eficacia tumoral *in vivo* en ratones lampiños atímicos inyectados con 5×10^6 de células de
15 linfoma humano Daudi en el flanco derecho. Los tumores se dejaron crecer entre 600 mm^3 y 900 mm^3 y los ratones se trataron con PBS, 30 mg/kg de ABX, 12 mg/kg de rituximab, 12 mg/kg de rituximab + 30 mg/kg de ABX, o AR160. La respuesta del tumor se determinó el día 7 después del
20 tratamiento por el cambio porcentual en el tamaño tumoral del primer día de tratamiento. Se determinó la significancia a través de prueba t de Student; el cambio porcentual desde el inicio era significativamente diferente entre los ratones tratados con AR160 y todos los otros grupos ($p < 0,0001$).

La figura 6C muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier generadas a partir del experimento que se muestra en la figura 6B. Se muestra la supervivencia media para cada grupo de tratamiento. Se utilizó una prueba de Mantle-Cox para
5 determinar si las diferencias de curvas de supervivencia eran significativas.

La figura 7A demuestra la adición de otro fármaco de quimioterapia (cisplatino) cisplatino con AB160. Se incubó ABX (5 mg/ml) con cisplatino (0,5 mg/ml) a temperatura medida
10 durante 30 minutos y se midió el cisplatino libre a través de HPLC en el sobrenadante después de la eliminación del particulado ABX. La cantidad de cisplatino libre se sustrajo de la concentración inicial para determinar la cantidad de cisplatino unido a ABX. Los datos se representan en una
15 gráfica en columnas, junto con la concentración inicial (cisplatino).

La figura 7B muestra la toxicidad de ABX unido a cisplatino (AC) en un ensayo de proliferación de células de melanoma humano A375. Después de 24 horas de exposición al fármaco e
20 incorporación de EdU, las células se fijaron, permeabilizaron y etiquetaron con un anticuerpo anti-EdU conjugado con FITC. Los datos se representan en una gráfica del índice de proliferación, que es el porcentaje de células positivas de FITC en pocillos tratados en comparación con las células

positivas de FITC en el pocillo sin tratar (el mayor nivel de proliferación).

La figura 7C muestra la eficacia tumoral *in vivo* de AC (complejo ABC; ABX unido a cisplatino) en ratones lampiños atímicos inyectados con células de melanoma humano 1×10^6 A375 en el flanco derecho. Los tumores se dejaron crecer entre 600 mm^3 y 900 mm^3 y los ratones se trataron con PBS, 30 mg/kg de ABX, 2 mg/kg de cisplatino, AB160, 2 mg/kg de cisplatino + AB160 o ABC160. La respuesta del tumor se determinó el día 7 después del tratamiento por el cambio porcentual en el tamaño tumoral del día de tratamiento. Se determinó la significancia a través de prueba t de Student; el cambio porcentual desde el inicio era significativamente diferente entre los ratones tratados con ABC160 y ratones tratados con PBS, cisplatino o ABX ($p < 0,0001$). No hubo diferencia significativa entre los grupos tratados con AB160, AB160 + cisplatino y ABC160 para el cambio porcentual del día 7 después del tratamiento desde el inicio.

La figura 7D muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier generadas en base al experimento que se muestra en la figura 7C y se muestra la supervivencia media para cada grupo de tratamiento. Se utilizó una prueba de Mantle-Cox para determinar si las diferencias de curvas de supervivencia eran significativas.

La figura 8A muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, se almacenaron a temperatura ambiente durante un mes y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX nuevos solos.

5 La figura 8B muestra la capacidad de unión al ligando (VEGF) de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, se almacenaron a temperatura ambiente durante un mes y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX nuevos solos.

La figura 8C muestra la toxicidad de células de cáncer *in*
10 *vitro* de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, se almacenaron a temperatura ambiente durante un mes y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX nuevos solos.

La figura 8D muestra la distribución de tamaño de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, se almacenaron a
15 temperatura ambiente durante diez meses y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX nuevos solos.

La figura 8E muestra la capacidad de unión al ligando (VEGF) de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, se almacenaron a temperatura ambiente durante diez meses y se
20 reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX nuevos solos.

La figura 8F muestra la toxicidad de células de cáncer *in vitro* de las nanopartículas AB160 que se liofilizaron, se almacenaron a temperatura ambiente durante diez meses y se reconstituyeron, en comparación con AB160 o ABX nuevos solos.

Las figuras 9A-C muestran la distribuciones de tamaño de los complejos ABX-BEV en condiciones de infusión I.V. (concentración final de ABX de 5 mg/mL) incubados en salina a temperatura ambiente durante más de 24 horas (figuras A y B).

5 A las 4 horas a temperatura ambiente, aparece algo de evidencia de descomposición de complejo con ELISA (20 %, figura C).

La figura 10 muestra la incubación *in vitro* durante 30 segundos de ABX (panel superior) o AB160 (panel inferior) en
10 salina o plasma humano heparinizado en proporciones en volumen relativas de 9:1 o 1:1.

Las figuras 11A-E muestran la evaluación *in vivo* de ratones lampiños atímicos inyectados con células de melanoma humano 1×10^6 A375 en el flanco derecho y tratados con (figura 11A)
15 PBS, (figura 11B) 12 mg/kg de BEV, (figura 11C) 30 mg/kg de ABX, (figura 11D) AB160 o (figura 11E) pretratados con 01,2 mg/kg de BEV y, 24 h después, AB160. Se representan los datos en el día 7 y el día 10 del tratamiento como volumen tumoral en mm³.

20 La figura 11F resume los datos del día 7 después del tratamiento de las figuras 11A-E.

La figura 11G resume los datos del día 10 después del tratamiento de las figuras 11A-E.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Luego de leer la presente descripción, para el experto en la técnica será evidente la manera de implementar la invención en diversas modalidades alternativas y aplicaciones alternativas. Sin embargo, en la presente no se describen todas las diversas modalidades de la presente invención. Se entenderá que las modalidades presentadas aquí se presentan solo a modo de ejemplo, y no de limitación. Como tal, no se considerará que esta descripción detallada de diversas modalidades alternativas limita el alcance o la amplitud de la presente invención como se establece a continuación.

Antes de divulgar y describir la presente invención, se entenderá que los aspectos descritos a continuación no se limitan a composiciones específicas, métodos para preparar esas composiciones o usos de estas, dado que estos, por supuesto, varían. También se entenderá que la terminología empleada en la presente es para describir aspectos particulares únicamente y no se pretende que sea limitativa.

La descripción detallada de la invención se divide en diversas secciones solo para la conveniencia del lector y la descripción encontrada en cualquier sección se puede combinar con la de otra sección. En la memoria descriptiva se pueden utilizar títulos o subtítulos para conveniencia del lector, que no pretenden influir en el alcance de la presente

invención.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado comúnmente comprendido por el experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención. En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una cantidad de términos, los cuales tendrán los significados estipulados a continuación:

La terminología usada en la presente tiene el único fin de describir modalidades particulares y no pretende limitar la invención. Tal como se usan en la presente, las formas singulares de "un", "uno" y "el" incluyen también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

«Opcional» u «opcionalmente» significan que el evento o la circunstancia descritos posteriormente pueden o no ocurrir y que la descripción incluye instancias en las que el evento o la circunstancia ocurren e instancias en las que no ocurren.

El término "aproximaciones" cuando se utiliza antes de una designación numérica, p. ej., temperatura, tiempo, cantidad, concentración, y otros, incluso un intervalo, indica aproximaciones que pueden variar en un (+) o (-) 10 %, 5 %, 1 % o cualquier subintervalo o subvalor intermedio.

Preferentemente, el término "aproximadamente" cuando se utiliza con respecto a una cantidad de dosis significa que la dosis puede variar en un $\pm 10\%$. Por ejemplo, "entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos" indica
5 que una superficie exterior de una nanopartícula contiene una cantidad de anticuerpo de entre 360 y 880 partículas.

"Que comprende" o "comprende" significa que las composiciones y los métodos incluyen los elementos enumerados, pero no se excluyen otros. "Consiste básicamente en" cuando se usa para
10 definir composiciones y métodos, significará que excluye otros elementos de cualquier importancia para la combinación para el fin establecido. Por ende, una composición que consiste esencialmente en los elementos según se definen en la presente no excluye otros materiales o etapas que no
15 afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. "Consiste en" significa que se excluyen más de un elemento traza de otros ingredientes y etapas del método sustanciales. Las modalidades definidas por cada uno de estos términos de transición se encuentran dentro
20 del alcance de esta invención.

El término "nanopartícula", tal como se utiliza en la presente, se refiere a nanopartículas que tienen al menos una dimensión que es inferior a 5 micrones. En modalidades preferidas, por ejemplo para la administración intravenosa,

la nanopartícula es inferior a 1 micrón. Para la administración directa, la nanopartícula es más grande. La invención contempla expresamente partículas incluso más grandes.

5 En una población de partículas, el tamaño de las partículas individuales se distribuye alrededor de una media. Los tamaños de partícula para la población, por lo tanto, se pueden representar con un promedio, y también con percentiles. D50 es el tamaño de partícula debajo del cual se
10 encuentran el 50 % de las partículas. El 10 % de las partículas son más pequeñas que el valor de D10 y el 90 % de las partículas son más pequeñas que D90. Cuando no está claro, el tamaño "promedio" es equivalente a D50. Entonces, por ejemplo, AB160 se refiere a nanopartículas que tienen un
15 tamaño promedio de 160 nanómetros.

El término "nanopartícula" también puede abarcar multímeros discretos de nanopartículas de unidad más pequeña. Por ejemplo, una partícula de 320 nm comprende un dímero de una unidad de nanopartícula de 160 nm. Para nanopartículas de
20 160 nm, por lo tanto, los multímeros son de aproximadamente 320 nm, 480 nm, 640 nm, 800 nm, 960 nm, 1120 nm, y así sucesivamente.

La frase "proteína portadora", tal como se utiliza en la presente, se refiere a proteínas que funcionan para

transportar anticuerpos y/o agentes terapéuticos. Los anticuerpos de la presente descripción se pueden unir de forma reversible a las proteínas portadoras. Más abajo se describen detalladamente proteínas portadoras ejemplares.

5 El término "núcleo", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una porción central o interna de la nanopartícula que puede estar compuesta por una proteína portadora, una proteína portadora y un agente terapéutico, u otros agentes o combinación agentes. En algunas modalidades, se puede
10 incorporar una porción hidrofóbica del anticuerpo en el núcleo.

La frase "agente terapéutico", tal como se utiliza en la presente, significa un agente que es terapéuticamente útil, p. ej., un agente para el tratamiento, remisión o atenuación
15 de un estado de enfermedad, afección fisiológica, síntomas o factores etiológicos, o para la evaluación o diagnóstico de estos. Un agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico, por ejemplo, inhibidores mitóticos, inhibidores de topoisomerasa, esteroides, antibióticos
20 antitumorales, antimetabolitos, agentes alquilantes, enzimas, inhibidores de proteasoma o cualquier combinación de estos.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos", tal como se utiliza en la presente, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de

inmunoglobulina (es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno). El término también se refiere a anticuerpos compuestos por dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina así como una variedad de formas que incluyen anticuerpos de longitud completa y porciones de estos; incluso, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo humanizado, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido a disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio simple (dAb), un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico doble, un anticuerpo anti-idiotípico, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de unión al epítipo funcionalmente activo de este, anticuerpos híbridos bifuncionales (p. ej., Lanzavecchia et al., *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)) y cadenas simples (p. ej., Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 85, 5879-5883 (1988) y Bird et al., *Science* 242, 423-426 (1988), que se incorporan a la presente mediante referencia). (Véase, en general, Hood et al., *Immunology*, Benjamin, N.Y., 2° ed. (1984); Harlow y Lane, *Antibodies. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Hunkapiller y Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986), que se incorporan a la presente mediante referencia).

El anticuerpo puede ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgA, IgM, IgE o IgD). Preferentemente, el anticuerpo es IgG. Un anticuerpo puede ser no humano (p. ej., de ratón, cabra o cualquier otro animal), completamente humano, humanizado o quimérico.

El término "constante de disociación", también denominada " K_d ", se refiere a una cantidad que expresa el grado al cual una sustancia particular se separa en componentes individuales (p. ej., la proteína portadora, el anticuerpo y el agente terapéutico opcional).

Los términos "liofilizado", "liofilización" y similares, tal como se utilizan en la presente, se refieren a un proceso a través del cual el material (p. ej., nanopartículas) que se seca primero se congela y luego se retira el hielo o disolvente congelado por sublimación en un ambiente de vacío. Opcionalmente, se incluye un excipiente en formulaciones preliofilizadas para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento. En algunas modalidades, las nanopartículas se pueden formar a partir de componentes liofilizados (proteína portadora, anticuerpo y agente terapéutico opcional) antes del uso como un agente terapéutico. En otras modalidades, la proteína portadora, el anticuerpo y el agente terapéutico opcional primero se combinan en nanopartículas y luego se liofilizan. La muestra

liofilizada además puede contener excipientes adicionales.

La frase "agentes de carga" comprende agentes que proporcionan la estructura del producto liofilizado. Algunos ejemplos comunes utilizados para agentes de carga incluyen
5 manitol, glicina, lactosa y sucrosa. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden impartir cualidades útiles con respecto a la modificación de la temperatura de colapso, proporcionando protección de congelamiento-descongelamiento y mejorando la
10 estabilidad de la proteína sobre el almacenamiento a largo plazo. Estos agentes también pueden servir como modificadores de tonicidad.

El término "amortiguador" abarca los agentes que mantienen el pH de solución en un intervalo aceptable antes de la
15 liofilización y puede incluir succinato (sodio o potasio), histidina, fosfato (sodio o potasio), Tris(tris(hidroximetil)aminometano), dietanolamina, citrato (sodio) y similares. El amortiguador de la presente invención tiene un pH en el intervalo de entre aproximadamente 5,5 y
20 aproximadamente 6,5; y preferentemente tiene un pH de aproximadamente 6,0. Los ejemplos de amortiguadores que controlarán el pH en este rango incluyen succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros amortiguadores ácidos orgánicos.

El término "crioprotectores" en general incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína contra las tensiones inducidas por congelamiento, presumiblemente por ser preferentemente excluidos de la superficie de la proteína.

5 También pueden ofrecer protección durante el secado primario y secundario, y el almacenamiento del producto a largo plazo. Algunos ejemplos son polímeros tales como dextrano y polietilenglicol; azúcares tales como sucrosa, glucosa, trehalosa y lactosa; tensioactivos tales como polisorbatos; y
10 aminoácidos tales como glicina, arginina y serina.

El término "lioprotector" incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante el proceso de secado o "deshidratación" (ciclos de secado primario y secundario), presumiblemente al proporcionar una matriz vidriosa amorfa y
15 al unirse con la proteína a través de enlace de hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que se eliminan durante el proceso de secado. Esto ayuda a mantener la conformación de la proteína, minimiza la degradación de la proteína durante el ciclo de liofilización y mejora los productos a largo
20 plazo. Algunos ejemplos incluyen polioles o azúcares tales como sucrosa y trehalosa.

La frase "formulación farmacéutica" se refiere a preparaciones que se encuentran en una forma tal que permiten que los ingredientes activos sean efectivos, y que no

contienen ningún componente adicional que sea tóxico para los sujetos a los cuales se les administra la formulación.

Los excipientes (vehículos, aditivos) «farmacéuticamente aceptables» son aquellos que se pueden administrar a un
5 sujeto mamífero en forma razonable a fin de proveer una dosis efectiva del ingrediente activo utilizado.

“Tiempo de reconstitución” es el tiempo que se necesita para rehidratar una formulación liofilizada con una solución a una solución clarificada libre de partículas.

10 Una formulación “estable” es aquella en la cual la proteína de esta retiene esencialmente su estabilidad física y/o su estabilidad química y/o su actividad biológica una vez almacenado.

El término “epítopo”, tal como se utiliza en la presente, se
15 refiere a la porción de un antígeno que es reconocida por un anticuerpo. Los epítopos incluyen, entre otros, una secuencia de aminoácidos corta o péptido (opcionalmente glicosilado o modificado de otro modo) que permite una interacción específica con una proteína (p. ej., un anticuerpo) o
20 ligando. Por ejemplo, un epítopo puede ser una parte de una molécula a la cual se une el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo.

La frase “que trata” o “tratamiento” cubre el tratamiento de una enfermedad o trastorno (p. ej., cáncer), en un sujeto,

por ejemplo un ser humano, e incluye: (i) inhibir una enfermedad o trastorno, es decir, detener su desarrollo; (ii) aliviar una enfermedad o trastorno, es decir, provocar regresión del trastorno; (iii) ralentizar el avance del trastorno; y/o (iv) inhibir, aliviar o ralentizar el avance de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. En algunas modalidades, "que trata" o "tratamiento" se refiere a la destrucción de células de cáncer.

El término "destruir" con respecto a un tratamiento de cáncer incluye cualquier tipo de manipulación que conduce a la muerte de esa célula de cáncer o al menos una parte de una población de células de cáncer.

Adicionalmente, algunos términos utilizados en la presente memoria descriptiva se definen más específicamente a continuación.

Descripción general

La presente invención se basa, en parte, en el hallazgo sorprendente de que las nanopartículas opcionalmente liofilizadas que comprenden una proteína portadora, un anticuerpo y un agente terapéutico, proporcionan terapia dirigida a un tumor mientras minimizan la toxicidad para el paciente. Las nanopartículas como se describen en la presente, por ende, son una mejora considerable contra ADC convencionales.

Para que los ADC convencionales sean efectivos, es fundamental que el enlazador sea lo suficientemente estable para no disociarse en la circulación sistémica pero que permita una liberación de fármaco suficiente en el sitio del tumor. Alley, S.C., et al. (2008) *Bioconjug Chem* 19:759-765. Esto ha demostrado ser un obstáculo importante en el desarrollo de un conjugado de fármaco eficaz (Julien, D.C., et al. (2011) *MAbs* 3:467-478; Alley, S.C., et al. (2008) *Bioconjug Chem* 19:759-765); por lo tanto, una característica atractiva del conjugado nanoinmunitario es que no se necesita un enlazador bioquímico.

Otra deficiencia de los ADC actuales es que la mayor penetración de fármaco en el tumor no se ha demostrado sustancialmente en tumores humanos. Algunas pruebas tempranas de ADC en modelos de ratón sugirieron que dirigir tumores con anticuerpos provoca una mayor concentración del agente activo en el tumor (Deguchi, T. et al. (1986) *Cancer Res* 46: 3751-3755); sin embargo, esto no se ha correlacionado en el tratamiento de enfermedades humanas, probablemente porque los tumores humanos son mucho más heterogéneos en permeabilidad que los tumores de ratón. Jain, R.K. et al. (2010) *Nat Rev Clin Oncol* 7:653-664. Además, el tamaño de la nanopartícula es fundamental para la extravasación de la vasculatura en el tumor. En un estudio con ratón que utilizaba un modelo de

5 xenotrasplante de adenocarcinoma de colon humano, los poros vasculares eran permeables a liposomas hasta 400 nm. Yuan, F., et al. (1995) *Cancer Res* 55: 3752-3756. Otro estudio de tamaño de poros tumorales y permeabilidad demostró que ambas características dependían del estado de crecimiento y ubicación del tumor, con tumores regresivos y tumores craneales permeables a partículas inferiores a 200 nm. Hobbs, S.K., et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci EUA* 95:4607-4612. El conjugado nanoinmunitario descrito en la presente supera este problema por el hecho de que el complejo grande, que es inferior a 200 nm intacto, se disocia parcialmente en la circulación sistémica en unidades funcionales más pequeñas que son fácilmente capaces de permear tejido tumoral. Además, una vez que el conjugado llega al sitio del tumor, la carga útil tóxica más pequeñas se puede liberar y solo la porción tóxica necesita ser absorbida por las células tumorales, no el conjugado completo.

20 La aparición de nanopartículas de albúmina recubiertas con anticuerpo (es decir, AVASTIN®) que contienen un agente terapéutico (es decir, ABRAXANE®) ha conducido a un nuevo paradigma de administración direccional de dos o más agentes terapéuticos a un sitio predeterminado *in vivo*. Véase las publicaciones de patentes PCT N. WO 2012/154861 y WO 2014/055415, cada una de las cuales se incorpora a la

presente en su totalidad mediante referencia.

Cuando las composiciones de albúmina y un anticuerpo se mezclan en una solución acuosa en concentraciones y proporciones específicas, los anticuerpos se autoensamblan espontáneamente en y sobre la albúmina para formar nanopartículas que tienen múltiples copias del anticuerpo (hasta 500 o más). Sin pretender limitarse a ninguna teoría, se contempla que la porción receptora del antígeno del anticuerpo está posicionada hacia afuera desde la nanopartícula mientras que la cola hidrofóbica se integra a la albúmina mediante interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas. Aunque las composiciones de proteína que comprenden una proteína fuente simple comúnmente se almacenan en forma liofilizada donde presentan una vida útil significativa, dichas composiciones liofilizadas no contienen una nanopartícula autoensamblada de dos proteínas diferentes integradas por interacciones hidrofóbicas-hidrofóbicas. Además, la configuración de nanopartícula en donde una mayoría de las porciones de unión al anticuerpo están expuestas en la superficie de las nanopartículas se presta a ser susceptible al desplazamiento o reconfiguración por condiciones que de otro modo se considerarían benignas. Por ejemplo, durante la liofilización, las cargas iónicas en las proteínas se deshidratan, exponiendo así las cargas

subyacentes. Las cargas expuestas permiten interacciones carga-carga entre las dos proteínas que pueden alterar la afinidad de unión de cada proteína a la otra. Además, la concentración de las nanopartículas aumenta
5 significativamente a medida que se elimina el disolvente (p. ej., agua). Dicho aumento de las concentraciones de las nanopartículas puede conducir a una oligomerización irreversible. La oligomerización es una propiedad conocida de las proteínas que reduce las propiedades biológicas del
10 oligómero en comparación con la forma monomérica y aumenta el tamaño de la partícula, a veces más allá de 1 micrón.

Por otra parte, se necesita una forma estable de una composición de nanopartícula para el uso clínico y/o comercial cuando se requiere una vida útil de al menos 3
15 meses y se prefieren vidas útiles superiores a 6 meses o 9 meses. Dicha composición estable debe estar fácilmente disponible para inyección intravenosa, debe retener su forma autoensamblada tras la inyección intravenosa para dirigir la nanopartícula hacia el sitio predeterminado *in vivo*, debe
20 tener un tamaño máximo inferior a 1 micrón para evitar cualquier evento isquémico cuando se administra en el torrente sanguíneo y, finalmente, debe ser compatible con la composición acuosa utilizada para la inyección.

Compuestos

Como resultará evidente para el experto en la técnica tras la lectura de la presente descripción, la presente descripción se refiere a las composiciones de nanopartículas que contienen una proteína portadora, anticuerpos y, 5 opcionalmente, al menos un agente terapéutico, en donde dichas composiciones están, opcionalmente, liofilizadas.

En algunas modalidades, la proteína portadora puede ser albúmina, gelatina, elastina (incluido topoe elastina) o polipéptidos derivados de elastina (p. ej., α -elastina y 10 polipéptidos tipo elastina (ELP)), gliadina, legumina, zeína, proteína de soja (p. ej., aislado de proteína de soja (SPI)), proteína de leche (p. ej., β -lactoglobulina (BLG) y caseína) o proteína de suero (p. ej., concentrados de proteína de soja (WPC) y aislados de proteína de suero (WPI)). En modalidades 15 preferidas, la proteína portadora es albúmina. En modalidades preferidas, la albúmina es clara de huevo (ovalbúmina), albúmina de suero bovino (BSA) o similar. En modalidades incluso más preferidas, la proteína portadora es albúmina de suero humano (HSA). En algunas modalidades, la proteína 20 portadora es un excipiente que, en general, se considera seguro (GRAS) aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA).

En algunas modalidades, los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en ado-trastuzumab emtansina, alemtuzumab,

bevacizumab, cetuximab, denosumab, dinutuximab, ipilimumab, nivolumab, obinutuzumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, rituximab y trastuzumab. En algunas modalidades, los anticuerpos son una capa sustancialmente simple de anticuerpos en toda o en parte de la superficie de la nanopartícula.

La tabla 1 ilustra una lista no taxativa de anticuerpos.

Tabla 1: Anticuerpos

Anticuerpos		
	Biológico	Tratamiento(s)/Diana(s)
Anticuerpos monoclonales (MAb)	Rituximab (Rituxan ®)	Linfoma no Hodgkin
	Alemtuzumab (Campath®)	Leucemia linfocítica crónica (CLL)
	Ipilimumab (Yervoy®)	Melanoma metastásico
	Bevacizumab (Avastin®)	Cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de ovario, glioblastoma multiforme
	Cetuximab (Erbix®)	Cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, glioblastoma, epitelio ovárico, cáncer de trompas de Falopio o peritoneal primario, cáncer de células renales
	Panitumumab (Vectibix®)	Cáncer colorrectal
	Trastuzumab (Herceptin®)	Cáncer de mama, adenocarcinoma
	⁹⁰ Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin®)	Linfoma no Hodgkin
	Ado-trastuzumab emtansine (Kadcycla®, también denominado TDM-1)	Cáncer de mama
	Brentuximab vedotin (Adcetris®)	Linfoma de Hodgkin, linfoma de células grandes anaplásico
	Blinatumomab (Blincyto)	Leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés)
	Pembrolizumab (Keytruda®)	PD-1 (melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas)

Anticuerpos		
	Biológico	Tratamiento(s)/Diana(s)
	Nivolumab (Opdivo®)	PD-1 (melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas)
	Ofatumumab (Arzerra®)	Leucemia linfocítica crónica (CLL)
	Pertuzumab (Perjeta®)	Cáncer de mama
	Obinutuzumab (Gazyva®)	Linfoma
	Dinutuximab (Unituxin®)	Neuroblastoma
	Denosumab (Prolia®)	Metástasis óseas, mieloma múltiple, tumor de células gigantes de hueso

En algunas modalidades, el al menos un agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en abiraterona, bendamustina, bortezomib, carboplatino, cabazitaxel, cisplatino, clorambucilo, dasatinib, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etopósido, everolimus, gefitinib, idarubicina, imatinib, hidroxiurea, imatinib, lapatinib, leuprorelina, melfalán, metotrexato, mitoxantrona, nedaplatino, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, pazopanib, pemetrexed, picoplatino, romidepsina, satraplatino, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, tenipósido, triplatino, vinblastina, vinorelbina, vincristina y ciclofosfamida.

La tabla 2 ilustra una lista no taxativa de agentes terapéuticos contra el cáncer.

Tabla 2: agentes terapéuticos contra el cáncer

Fármacos contra el cáncer	
Fármaco	Diana(s)
Abitrexate (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica gestacional, cáncer de cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
Abraxane (formulación de	Cáncer de mama; cáncer de pulmón de

nanopartículas de paclitaxel estabilizadas con albúmina)	células no pequeñas; cáncer de páncreas
ABVD (adriamicina, bleomicina, sulfato de vinblastina, dacarbazina)	Linfoma de Hodgkin
ABVE (adriamicina, bleomicina, sulfato de vincristina, etopósido)	Linfoma de Hodgkin (en niños)
ABVE-PC (adriamicina, bleomicina, sulfato de vincristina, etopósido, prednisona, ciclofosfamida)	Linfoma de Hodgkin (en niños)
AC (ciclofosfamida de adriamicina)	Cáncer de mama
AC-T (adriamicina, ciclofosfamida, Taxol)	Cáncer de mama
Adcetris (Brentuximab Vedotin)	Linfoma de células grandes anaplásico; linfoma de Hodgkin
ADE (citarabina (Ara-C), clorhidrato de daunorrubicina, etopósido)	Leucemia mieloide aguda (en niños)
Ado-Trastuzumab emtansina	Cáncer de mama
Adriamicina (clorhidrato de doxorubicina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama, cáncer gástrico (estómago); linfoma de Hodgkin; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; cáncer de pulmón de células pequeñas; sarcomas de tejido blando y óseos; cáncer de tiroides; cáncer de vejiga de células de transición; tumor de Wilms
Adrucil (fluorouracilo)	Carcinoma de células basales; cáncer de mama; cáncer colorrectal; adenocarcinoma gástrico (estómago); cáncer de páncreas; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
Dimaleato de afatinib	Cáncer de pulmón no microcítico
Afinitor (Everolimus)	Cáncer de mama, cáncer de páncreas; carcinoma de células renales; astrocitoma de células gigantes subependimario
Alimta (pemetrexed disódico)	Mesotelioma pleural maligno; cáncer de pulmón de células no pequeñas
Ambochlorin (clorambucilo)	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
Anastrozol	Cáncer de mama
Aredia (pamidronate disódico)	Cáncer de mama; mieloma múltiple
Arimidex (anastrozol)	Cáncer de mama
Aromasin (exemestano)	Cáncer de mama avanzado; cáncer de mama de etapa temprana y positivo para el receptor de estrógeno
Arranon (nelarabina)	leucemia linfoblástica aguda de células T; linfoma linfoblástico de células T
Azacitidine	Síndromes mielodisplásicos
BEACOPP	Linfoma de Hodgkin
Becenum (carmustina)	Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin

Beleodaq (belinostat)	Linfoma de células T periféricas
BEP	Tumores de células germinales de ovario; tumores de células germinales de testículos
Bicalutamide	Cáncer de próstata
BiCNU (carmustina)	Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin
Bleomicina	Linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin; cáncer de pene; carcinoma de células escamosas de cuello uterino; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; carcinoma de células escamosas de vulva; cáncer de testículos
Bosulif (bosutinib)	Leucemia mielógena crónica
Brentuximab Vedotin	Linfoma de células grandes anaplásico; linfoma de Hodgkin
Busulfán	Leucemia mielógena crónica
Busulfex (busulfán)	Leucemia mielógena crónica
Cabozantinib-S-malato	Cáncer de tiroides medular
CAF	Cáncer de mama
Camptosar (clorhidrato de irinotecán)	Cáncer colorrectal
CAPOX	Cáncer colorrectal
Carfilzomib	Mieloma múltiple
Casodex (bicalutamide)	Cáncer de próstata
CeeNU (lomustina)	Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin
Ceritinib	Cáncer de pulmón no microcítico
Cerubidine (clorhidrato de daunorrubicina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda
Clorambucilo	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
CLORAMBUCILO-PREDNISONA	Leucemia linfocítica crónica
CHOP	Linfoma no Hodgkin
Cisplatino	Cáncer de vejiga; cáncer de cuello uterino; mesotelioma maligno; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cancer de testículos
Clafen (ciclofosfamida)	leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; micosis fungoide; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; retinoblastoma
Clofarex (clofarabina)	Leucemia linfoblástica aguda
CMF	Cáncer de mama
Cometriq (Cabozantinib-S-Malato)	Cáncer de tiroides medular
COPP	Linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
COPP-ABV	Linfoma de Hodgkin
Cosmegen (dactinomicina)	Sarcoma de Ewing; enfermedad

	trofoblástica gestacional; rabdomiosarcoma; tumores sólidos; cáncer de testículos; tumor de Wilms
CVP	Linfoma no Hodgkin; leucemia linfocítica crónica
Ciclofosfamida	leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; micosis fungoide; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; retinoblastoma.
Cyfos (ifosfamida)	Tumores de células germinales de testículos
Cyramza (Ramucirumab)	Adenocarcinoma; cáncer colorrectal; cáncer de pulmón de células no pequeñas
Citarabina	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; leucemia mielógena crónica; leucemia meníngea
Cytosar-U (citarabina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; leucemia mielógena crónica; leucemia meníngea
Cytosan (ciclofosfamida)	leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; micosis fungoide; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; retinoblastoma
Dacarbazina	Linfoma de Hodgkin; melanoma
Dacogen (decitabina)	Síndromes mielodisplásicos
Dactinomicina	Sarcoma de Ewing; enfermedad trofoblástica gestacional; rabdomiosarcoma; tumores sólidos; cáncer de testículos; tumor de Wilms
Clorhidrato de daunorrubicina	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda
Degarelix	Cáncer de próstata
Denileukin Diftitox	Linfoma de células T cutáneo
Denosumab	Tumor óseo de células gigantes; cáncer de mama, cáncer de próstata
DepoCyt (citarabina liposómica)	Meningitis linfomatosa
DepoFoam (citarabina liposómica)	Meningitis linfomatosa
Docetaxel	Cáncer de mama; adenocarcinoma de estómago o unión gastroesofágica; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de próstata; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
Doxil (liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
Clorhidrato de doxorubicina	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de

	mama; cáncer gástrico (estómago); linfoma de Hodgkin; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; cáncer de pulmón de células pequeñas; sarcomas de tejido blando y óseos; cáncer de tiroides; cáncer de vejiga de células de transición; tumor de Wilms.
Dox-SL (liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
DTIC-Dome (dacarbazina)	Linfoma de Hodgkin; melanoma
Efudex (fluorouracilo)	Carcinoma de células basales; cáncer de mama; cáncer colorrectal; adenocarcinoma gástrico (estómago); cáncer de páncreas; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
Ellence (clorhidrato de epirubicina)	Cáncer de mama
Eloxatin (oxaliplatino)	Cáncer colorrectal; cáncer de colon de etapa III
Emend (aprepitant)	Náuseas y vómitos provocados por quimioterapia y náuseas y vómitos después de una cirugía
Enzalutamide	Cáncer de próstata
Clorhidrato de epirubicina	Cáncer de mama
EPOCH	Linfoma no Hodgkin
Erbitux (cetuximab)	Cáncer colorrectal; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
Mesilato de eribulina	Cáncer de mama
Erivedge (vismodegib)	Carcinoma de células basales
Clorhidrato de erlotinib	Cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de páncreas
Erwinaze (Asparaginase Erwinia chrysanthemi)	Leucemia linfoblástica aguda
Etopophos (fosfato de etopósido)	Cáncer de pulmón de células pequeñas; cáncer de testículos
Evacet (liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
Everolimus	Cáncer de mama; cáncer de páncreas; carcinoma de células renales; astrocitoma de células gigantes subependimario
Evista (clorhidrato de raloxifeno)	Cáncer de mama
Exemestano	Cáncer de mama
Fareston (toremifeno)	Cáncer de mama
Farydak (panobinostat)	Mieloma múltiple
Faslodex (fulvestrant)	Cáncer de mama
FEC	Cáncer de mama
Femara (letrozol)	Cáncer de mama
Filgrastim	Neutropenia
Fludara (fosfato de fludarabina)	Leucemia linfocítica crónica
Fluoroplex (fluorouracilo)	Carcinoma de células basales; cáncer de mama; cáncer colorrectal; adenocarcinoma gástrico (estómago); cáncer de páncreas; carcinoma de

	células escamosas de cabeza y cuello
Folex (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica gestacional; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
FOLFIRI	Cáncer colorrectal
FOLFIRI-BEVACIZUMAB	Cáncer colorrectal
FOLFIRI-CETUXIMAB	Cáncer colorrectal
FOLFIRINOX	Cáncer de páncreas
FOLFOX	Cáncer colorrectal
Folotyn (pralatrexato)	Linfoma de células T periféricas
FU-LV	Cáncer colorrectal; cáncer de esófago; cáncer gástrico
Fulvestrant	Cáncer de mama
Gefitinib	Cáncer de pulmón no microcítico
Clorhidrato de gemcitabina	Cáncer de mama; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas
GEMCITABINA-CISPLATINO	Cáncer del tracto biliar; cáncer de vejiga; cáncer de cuello uterino; mesotelioma maligno; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas
GEMCITABINA-OXALIPLATINO	Cáncer de páncreas
Gemtuzumab Ozogamicin (conjugado de anticuerpo y fármaco)	Leucemia mieloide aguda
Gemzar (clorhidrato de gemcitabina)	Cáncer de mama; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas
Gilotrif (dimaleato de afatinib)	Cáncer de pulmón no microcítico
Gleevec (mesilato de imatinib)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia eosinofílica crónica o síndrome hipereosinofílico; leucemia mielógena crónica; dermatofibrosarcoma protuberans; tumor estromal gastrointestinal; neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas; mastocitosis sistémica.
Gliadel (implante de carmustina)	Glioblastoma multiforme; glioma maligno
Acetato de goserelina	Cáncer de mama; cáncer de próstata
Halaven (mesilato de eribulina)	Cáncer de mama
Hycamtin (clorhidrato de topotecán)	Cáncer de cuello de útero; cáncer de ovario; cáncer de pulmón de células pequeñas
Hyper-CVAD	Leucemia linfoblástica aguda; linfoma no Hodgkin
Ibrance (palbociclib)	Cáncer de mama
Ibrutinib	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de células del manto;
ICE	Linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
Iclusig (clorhidrato de ponatinib)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mielógena crónica

Idamycin (clorhidrato de idarrubicina)	Leucemia mieloide aguda
Mesilato de Imatinib	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia eosinofílica crónica o síndrome hipereosinofílico; leucemia mielógena crónica; dermatofibrosarcoma protuberans; tumor estromal gastrointestinal; neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas; mastocitosis sistémica.
Imbruvica (ibrutinib)	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de células del manto; macroglobulinemia de Waldenström
Inlyta (axitinib)	Carcinoma de células renales
Iressa (gefitinib)	Cáncer de pulmón no microcítico
Clorhidrato de irinotecán	Cáncer colorrectal
Istodax (romidepsina)	Linfoma de células T cutáneo
Ixempra (ixabepilona)	Cáncer de mama
Jevtana (cabazitaxel)	Cáncer de próstata
Keoxifene (clorhidrato de raloxifeno)	Cáncer de mama
Kyprolis (carfilzomib)	Mieloma múltiple
Lenvima (mesilato de lenvatinib)	Cáncer de tiroides
Letrozol	Cáncer de mama
Leucovorin Calcium	Cáncer colorrectal
Leukeran (clorambucilo)	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
Acetato de leuprolida	Cáncer de próstata
Linfolizín (clorambucilo)	Leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin
LipoDox (liposoma de clorhidrato de doxorubicina)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; mieloma múltiple; cáncer de ovarios
Lomustina	Tumores cerebrales; linfoma de Hodgkin
Lupron (acetato de leuprolida)	Cáncer de próstata
Lynparza (olaparib)	Cáncer de ovario
Marqibo (liposoma de sulfato de vincristina)	Leucemia linfoblástica aguda
Matulane (clorhidrato de procarbazona)	Linfoma de Hodgkin
Clorhidrato de mecloretamina	Carcinoma broncogénico; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; efusión pleural maligna, efusión pericardial maligna y efusión peritoneal maligna; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin
Megace (acetato de megestrol)	Cáncer de mama; cáncer de endometrio
Mekinist (trametinib)	Melanoma
Mercaptopurina	Leucemia linfoblástica aguda
• Mesnex (mesna)	Cistitis hemorrágica
• Methazolastone (temozolomide)	Astrocitoma anaplásico; glioblastoma multiforme
Mexate (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer

	de mama; enfermedad trofoblástica gestacional; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
Mexate-AQ (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica gestacional; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de pulmón; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
Clorhidrato de mitoxantrona	Leucemia mieloide aguda; cáncer de próstata
Mitozytrex (mitomicina C)	Adenocarcinoma gástrico (estómago) y pancreático
MOPP	Linfoma de Hodgkin
Mozobil (Plerixafor)	Mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin
Mustargen (clorhidrato de mecloretamina)	Carcinoma broncogénico; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; efusión pleural maligna, efusión pericardial maligna y efusión peritoneal maligna; micosis fungoide; linfoma no Hodgkin
Myleran (busulfán)	Leucemia mielógena crónica
Mylotarg (Gemtuzumab Ozogamicin)	Leucemia mieloide aguda
Nanopartícula de Paclitaxel (formulación de nanopartículas de paclitaxel estabilizadas con albúmina)	Cáncer de mama; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de páncreas
Navelbine (tartrato de vinorelbina)	Cáncer de pulmón no microcítico
Nelarabina	Leucemia linfoblástica aguda de células T
Neosar (ciclofosfamida)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; cáncer de mama; leucemia linfocítica crónica; leucemia mielógena crónica; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; micosis fungoide; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; cáncer de ovarios; retinoblastoma
Nexavar (tosilato de Sorafenib)	Carcinoma hepatocelular; carcinoma de células renales; cáncer de tiroides
Nilotinib	Leucemia mielógena crónica
Nivolumab	Melanoma; cáncer de pulmón de células no pequeñas escamosas
Nolvadex (citrato de tamoxifeno)	Cáncer de mama
Odomzo (Sonidegib)	Carcinoma de células basales
OEPA	Linfoma de Hodgkin
OFF	Cáncer de páncreas
Olaparib	Cáncer de ovario
Oncaspar (Pegaspargase)	Leucemia linfoblástica aguda
OPPA	Linfoma de Hodgkin
Oxaliplatino	Cáncer colorrectal; cáncer de colon de etapa III
Paclitaxel	Sarcoma de Kaposi relacionado con el

	SIDA; cáncer de mama; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios
Formulación de nanopartículas de paclitaxel estabilizadas con albúmina	Cáncer de mama; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de páncreas
PAD	Mieloma múltiple
Palbociclib	Cáncer de mama
Pamidronate disódico	Cáncer de mama; mieloma múltiple
Panitumumab	Cáncer colorrectal
Panobinostat	Mieloma múltiple
Paraplat (carboplatino)	Cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios
Paraplatin (carboplatino)	Cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios
Clorhidrato de pazopanib	Carcinoma de células renales; sarcoma de tejido blando
Pegaspargasa	Leucemia linfoblástica aguda
Pemetrexed disódico	Mesotelioma pleural maligno; cáncer de pulmón de células no pequeñas
Platinol (cisplatino)	Cáncer de vejiga; cáncer de cuello uterino; mesotelioma maligno; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cancer de testículos
Platinal-AQ (cisplatino)	Cáncer de vejiga; cáncer de cuello uterino; mesotelioma maligno; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cancer de testículos
Plerixafor	Mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin
Pomalidomide	Mieloma múltiple
Pomalyst (pomalidomide)	Mieloma múltiple
Clorhidrato de pontinib	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mielógena crónica
Pralatrexate	Linfoma de células T periféricas
Prednisona	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia linfocítica crónica; linfoma de Hodgkin; mieloma múltiple; linfoma no Hodgkin; cáncer de próstata; timoma y carcinoma tímico
Clorhidrato de procarbazona	Linfoma de Hodgkin
Provenge (Sipuleucel-T)	Cáncer de próstata
Purinethol (mercaptopurina)	Leucemia linfoblástica aguda
Dicloruro de radio 223	Cáncer de próstata
Clorhidrato de raloxifeno	Cáncer de mama
R-CHOP	Linfoma no Hodgkin
R-CVP	Linfoma no Hodgkin
Regorafenib	Cáncer colorrectal; tumor estromal gastrointestinal
R-EPOCH	Linfoma no Hodgkin de células B
Revlimid (lenalidomida)	Linfoma de células del manto; mieloma múltiple; anemia
Rheumatrex (metotrexato)	Leucemia linfoblástica aguda; cáncer de mama; enfermedad trofoblástica

	gestacional; cáncer de cabeza y cuello; cáncer de pulmón; linfoma no Hodgkin; osteosarcoma
Romidepsin	Linfoma de células T cutáneo
Rubidomicina (clorhidrato de daunorrubicina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda
Sipuleucel-T	Cáncer de próstata
Somatuline Depot (acetato de lanreotida)	Tumores neuroendócrinos gastroenteropancreáticos
Sonidegib	Carcinoma de células basales
Tosilato de sorafenib	Carcinoma hepatocelular; carcinoma de células renales; cáncer de tiroides
Sprycel (dasatinib)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mielógena crónica
STANFORD V	Linfoma de Hodgkin
Stivarga (regorafenib)	Cáncer colorrectal; tumor estromal gastrointestinal
Malato de sunitinib	Tumor estromal gastrointestinal; cáncer de páncreas; carcinoma de células renales
Sutent (malato de sunitinib)	Tumor estromal gastrointestinal; cáncer de páncreas; carcinoma de células renales
Synovir (talidomida)	Mieloma múltiple
Synribo (mepesuccinato de omacetaxina)	Leucemia mielógena crónica
TAC	Cáncer de mama
Tafinlar (dabrafenib)	Melanoma
Citrato de tamoxifeno	Cáncer de mama
Tarabine PFS (citarabina)	Leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; leucemia mielógena crónica
Tarceva (clorhidrato de erlotinib)	Cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de páncreas
Targretin (bexaroteno)	Problemas en la piel provocados por linfoma de células T cutáneo
Tasigna (niltinib)	Leucemia mielógena crónica
Taxol (paclitaxel)	Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA; cáncer de mama; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de ovarios
Taxotere (docetaxel)	Cáncer de mama; adenocarcinoma; cáncer de pulmón de células no pequeñas; cáncer de próstata; carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
Temodar (temozolomida)	Astrocitoma anaplásico; glioblastoma multiforme
Temozolomida	Astrocitoma anaplásico; glioblastoma multiforme
Tiotepa	Cáncer de vejiga; cáncer de mama; efusión pleural maligna, efusión pericardial maligna y efusión peritoneal maligna; cáncer de ovarios
Toposar (etopósido)	Cáncer de pulmón de células pequeñas; cáncer de testículos
Clorhidrato de topotecán	Cáncer de cuello de útero; cáncer de

	ovario; cáncer de pulmón de células pequeñas
Toremifeno	Cáncer de mama
Torisel (temsirolimus)	Carcinoma de células renales
TPF	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; cáncer gástrico (estómago)
Trastuzumab	Adenocarcinoma; cáncer de mama
Treanda (clorhidrato de bendamustina)	Linfoma no Hodgkin de células B; leucemia linfocítica crónica
Trisenox (trióxido de arsénico)	Leucemia promielocítica aguda
Tykerb (ditosilato de lapatinib)	Cáncer de mama
Vandetabib	Cáncer de tiroides medular
VAMP	Linfoma de Hodgkin
VeIP	Cáncer germinal de ovario; cáncer de testículos
Velban (sulfato de vinblastina)	Cáncer de mama; coriocarcinoma; linfoma de Hodgkin; sarcoma de Kaposi; micosis fungoides; linfoma no Hodgkin; cáncer de testículos
Velcade (bortezomib)	Mieloma múltiple; linfoma de células de manto
Velsar (sulfato de vinblastina)	Cáncer de mama; coriocarcinoma; linfoma de Hodgkin; sarcoma de Kaposi; micosis fungoides; linfoma no Hodgkin; cáncer de testículos
VePesid (etopósido)	Cáncer de pulmón de células pequeñas; cáncer de testículos
Viadur (acetato de leuprolida)	Cáncer de próstata
Vidaza (azacitidina)	Síndromes mielodisplásicos
Vincasar PFS (sulfato de vincristina)	Leucemia aguda; linfoma de Hodgkin; neuroblastoma; linfoma no Hodgkin; rhabdomyosarcoma; tumor de Wilms
Liposoma de sulfato de vincristina	Leucemia linfoblástica aguda
Tartrato de vinorelbina	Cáncer de pulmón no microcítico
VIP	Cáncer de testículos
Visbodegib	Carcinoma de células basales
Voraxaze (glucarpidasa)	Niveles tóxicos en sangre del fármaco contra el cáncer metotrexato
Votrient (clorhidrato de Pazopanib)	Carcinoma de células renales; sarcoma de tejido blando
Wellcovorin (Leucovorin Calcium)	Cáncer colorrectal; anemia
Xalkori (crizotinib)	Cáncer de pulmón no microcítico
Xeloda (capecitabina)	Cáncer de mama; cáncer colorrectal
XELIRI	Cáncer colorrectal; cáncer de esófago; cáncer gástrico (estómago)
XELOX	Cáncer colorrectal
Xofigo (dicloruro de radio 223)	Cáncer de próstata
Xtandi (enzalutamida)	Cáncer de próstata
Zaltrap (Ziv-Aflibercept)	Cáncer colorrectal
Zelboraf (vemurafenib)	Melanoma
Ziv-Aflibercept	Cáncer colorrectal
Zoladex (acetato de goserelina)	Cáncer de mama; cáncer de próstata
Zolanza (vorinostat)	Linfoma de células T cutáneo
Zometa (ácido zoledrónico)	Mieloma múltiple
Zydelig (idelalisib)	Leucemia linfocítica crónica; linfoma

	no Hodgkin (linfoma no Hodgkin de células B folicular y linfoma linfocítico pequeño)
Zykadia (certinib)	Cáncer de pulmón no microcítico
Zytiga (acetato de abiraterona)	Cáncer de próstata

Debe entenderse que el agente terapéutico puede estar ubicado dentro de la nanopartícula, sobre la superficie exterior de la nanopartícula o ambos. La nanopartícula puede contener más de un agente terapéutico, por ejemplo, dos agentes terapéuticos, tres agentes terapéuticos, cuatro agentes terapéuticos, cinco agentes terapéuticos o más. Además, una nanopartícula puede contener los mismos agentes terapéuticos o diferentes dentro y fuera de la nanopartícula.

En algunas modalidades, cualquier proteína portadora, anticuerpo, agente terapéutico o cualquier combinación de estos se incluye expresamente. Por ejemplo, en algunas modalidades, una composición puede comprender cualquier proteína portadora y agente quimioterapéutico excepto Abraxane® y/o cualquier anticuerpo de direccionamiento excepto bevacizumab.

En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 100 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 200 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 300 anticuerpos no unidos

por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 400 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 500 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende al menos 600 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula.

En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1000 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 300 y aproximadamente 1000 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 400 y aproximadamente 1000 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 500 y aproximadamente 1000 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende

entre aproximadamente 600 y aproximadamente 1000 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 200 y aproximadamente 800 anticuerpos

5 no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En un aspecto, la nanopartícula comprende entre aproximadamente 300 y aproximadamente 800 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. En modalidades preferidas, la nanopartícula

10 comprende entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos no unidos por enlace covalente a la superficie de la nanopartícula. Los valores contemplados incluyen cualquier valor o subintervalo dentro de cualquiera de los intervalos mencionados, incluidos los extremos.

15 En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de menos de aproximadamente 1 μm . En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 1 μm . En un aspecto, el tamaño de

20 partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 900 nm. En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 800 nm. En un aspecto, el tamaño de partícula

promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 700 nm. En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y

5 aproximadamente 600 nm. En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 500 nm. En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y

10 aproximadamente 400 nm. En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y aproximadamente 300 nm. En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 130 nm y

15 aproximadamente 200 nm. En una modalidad preferida, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 150 nm y aproximadamente 180 nm. En una modalidad especialmente preferida, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de

20 aproximadamente 160 nm. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos mencionados, incluidos los extremos.

En un aspecto, la composición de nanopartículas se formula

para inyección intravenosa. Con el fin de evitar un evento isquémico, la composición de nanopartículas formulada para inyección intravenosa debe comprender nanopartículas con un tamaño de partícula promedio de menos de aproximadamente 1 μm .

En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de más de aproximadamente 1 μm . En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 5 μm . En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 4 μm . En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 3 μm . En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 2 μm . En un aspecto, el tamaño de partícula promedio en la composición de nanopartículas es de entre aproximadamente 1 μm y aproximadamente 1,5 μm . Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos mencionados, incluidos los extremos.

En un aspecto, la composición de nanopartículas se formula

para inyección directa en un tumor. La inyección directa incluye inyección en o próxima a un sitio de tumor, perfusión en un tumor y similares. Cuando se formula para inyección directa en un tumor, la nanopartícula puede comprender cualquier tamaño de partícula promedio. Sin pretender limitarse por la teoría, se cree es más probable que las partículas más grandes (p. ej., mayores de 500 nm, mayores de 1 μm y similares) se inmovilicen dentro del tumor, proporcionando así un efecto beneficioso. Las partículas más grandes se pueden acumular en el tumor u órganos específicos. Véase, p. ej., la partícula de vidrio de 20-60 micrones que se utiliza para inyectar en la arteria hepática que alimenta un tumor del hígado, denominada "TheraSphere®" (en uso clínico para cáncer de hígado). Por ende, para la administración intravenosa, se utilizan típicamente partículas inferiores a 1 μm . Las partículas superiores a 1 μm , más típicamente, se administran directamente en un tumor ("inyección directa") o en una arteria que alimenta que se alimenta en el sitio del tumor.

En un aspecto, menos de aproximadamente el 0,01 % de las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula mayor que 200 nm, mayor que 300 nm, mayor que 400 nm, mayor que 500 nm, mayor que 600 nm, mayor que 700 nm o mayor que 800 nm. En un aspecto, menos de aproximadamente el

0,001% de las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula mayor que 200 nm, mayor que 300 nm, mayor que 400 nm, mayor que 500 nm, mayor que 600 nm, mayor que 700 nm o mayor que 800 nm. En una modalidad preferida, menos de aproximadamente el 0,01 % de las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula mayor que 800 nm. En una modalidad más preferida, menos de aproximadamente el 0,001 % de las nanopartículas dentro de la composición tienen un tamaño de partícula mayor que 800 nm.

En un aspecto preferido, los tamaños y los intervalos de tamaño mencionados en la presente se refieren a los tamaños de partícula de la composición de nanopartículas liofilizada reconstituida. Es decir, después de que las nanopartículas liofilizadas se resuspenden en una solución acuosa (p. ej., agua, otro excipiente farmacéuticamente aceptable, amortiguador, etc.), el tamaño de partícula o el tamaño de partícula promedio se encuentra dentro del intervalo mencionado en la presente.

En un aspecto, al menos aproximadamente el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,5 % o el 99,9 % de las nanopartículas están presentes en la composición reconstituida como nanopartículas únicas. Es decir, menos de aproximadamente el 50 %, el 40 %, el 30 %, etc. de las nanopartículas están dimerizadas o

multimerizadas (oligomerizadas).

En algunas modalidades, el tamaño de la nanopartícula se puede controlar ajustando la cantidad (p. ej., la proporción) de proteína portadora a anticuerpo. El tamaño de las nanopartículas, y la distribución del tamaño, también es importante. Las nanopartículas de la invención se pueden comportar de modo diferente de acuerdo con su tamaño. Si el tamaño es grande, una aglomeración podría bloquear los vasos sanguíneos. Por ende, la aglomeración de las nanopartículas puede afectar el rendimiento y la seguridad de la composición. Por otra parte, partículas más grandes pueden resultar más terapéuticas en determinadas condiciones (p. ej., cuando no se administran por vía intravenosa).

En un aspecto, la composición de nanopartículas comprende al menos un agente terapéutico adicional. En una modalidad, el al menos un agente terapéutico adicional no está unido por enlace covalente a la superficie exterior de la nanopartícula. En una modalidad, el al menos un agente terapéutico adicional está dispuesto en la superficie exterior de la nanopartícula. En una modalidad, el al menos un agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en abiraterona, bendamustina, bortezomib, carboplatino, cabazitaxel, cisplatino, clorambucilo, dasatinib, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, erlotinib,

etopósido, everolimus, gemcitabina, gefitinib, idarubicina, imatinib, hidroxiurea, imatinib, lapatinib, leuprorelina, melfalán, metotrexato, mitoxantrona, nedaplatino, nilotinib, oxaliplatino, pazopanib, pemetrexed, picoplatino, romidepsina, satraplatino, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, tenipósido, triplatinato, vinblastina, vinorelbina, vincristina y ciclofosfamida. En una modalidad, el al menos un agente terapéutico adicional es anticuerpo contra el cáncer.

Métodos de producción de partículas

En algunos aspectos, la presente invención se refiere a métodos para producir composiciones de nanopartícula según se describen en la presente.

En un aspecto, las nanopartículas de la composición de nanopartículas se forman mediante contacto de la partícula de proteína portadora o proteína portadora-agente terapéutico con el anticuerpo en una proporción de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 10:30 de partícula de proteína portadora o partícula de proteína portadora-agente terapéutico a anticuerpo. En una modalidad, la proporción es de aproximadamente 10:2 a aproximadamente 10:25. En una modalidad, la proporción es de aproximadamente 10:2 a aproximadamente 1:1. En una modalidad preferida, la proporción es de aproximadamente 10:2 a aproximadamente 10:6. En una modalidad preferida especialmente, la proporción es de

aproximadamente 10:4. Las proporciones contempladas incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos mencionados, incluidos los extremos.

5 En una modalidad, la cantidad de solución u otro medio líquido empleado para formar las nanopartículas es particularmente importante. No hay formación de nanopartículas en una solución demasiado diluida de la proteína portadora (o proteína portadora-agente terapéutico)

10 y los anticuerpos. Una solución demasiado concentrada producirá agregados no estructurados. En algunas modalidades, la cantidad de solución (p. ej., agua estéril, solución salina, solución salina amortiguada con fosfato) empleada es de entre aproximadamente 0,5 mL de solución y aproximadamente

15 20 mL de solución. En algunas modalidades, la cantidad de proteína portadora es de entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 100 mg/mL. En algunas modalidades, la cantidad de anticuerpo es de entre aproximadamente 1 mg/mL y aproximadamente 30 mg/mL. Por ejemplo, en algunas

20 modalidades, la proporción de proteína portadora:anticuerpo:solución es de aproximadamente 9 mg de proteína portadora (p. ej., albúmina) a 4 mg de anticuerpo (p. ej., BEV) en 1 mL de solución (p. ej., salina). Una cantidad de agente terapéutico (p. ej., taxol) también se

puede agregar a la proteína portadora. Por ejemplo, a 1 mg de taxol se le pueden añadir 9 mg de proteína portadora (10 mg de proteína portadora-agente terapéutico) y 4 mg de anticuerpo en 1 mL de solución. Cuando se utiliza una típica
5 bolsa i.v., por ejemplo, con la solución de aproximadamente 1 litro se necesitaría emplear 1000x la cantidad de proteína portadora/proteína portadora-agente terapéutico y anticuerpos en comparación con lo utilizado en 1 mL. Por ende, no se pueden formar las presentes nanopartículas en una bolsa i.v.
10 estándar. Además, cuando se añaden los componentes a una bolsa i.v. estándar en las cantidades terapéuticas de la presente invención, los componentes no se autoensamblan para formar nanopartículas.

En una modalidad, la partícula de proteína portadora o
15 proteína portadora-agente terapéutico se pone en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8. En una modalidad, la partícula de proteína portadora o proteína portadora-agente terapéutico se pone en contacto con el anticuerpo en una
20 solución que tiene un pH de aproximadamente 4. En una modalidad, la partícula de proteína portadora o proteína portadora-agente terapéutico se pone en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 5. En una modalidad, la partícula de proteína portadora o

proteína portadora-agente terapéutico se pone en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6. En una modalidad, la partícula de proteína portadora o proteína portadora-agente terapéutico se pone en
5 contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 7. En una modalidad, la partícula de proteína portadora o proteína portadora-agente terapéutico se pone en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de aproximadamente 8. En una modalidad preferida, la partícula
10 de proteína portadora o proteína portadora-agente terapéutico se pone en contacto con el anticuerpo en una solución que tiene un pH de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 7.

En una modalidad, la partícula de proteína portadora o la partícula de proteína portadora-agente terapéutico se incuba
15 con el anticuerpo a una temperatura de entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 60 °C, o cualquier intervalo, subintervalo o valor dentro de ese intervalo, incluidos los extremos. En una modalidad preferida, la partícula de proteína portadora o proteína portadora-agente terapéutico se
20 incuba con el anticuerpo a una temperatura de entre aproximadamente 23 °C y aproximadamente 60 °C.

Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que la estabilidad de las nanopartículas dentro de la composición de nanopartículas depende, al menos en parte, de la temperatura

y/o el pH a los cuales se forman las nanopartículas, así como la concentración de los componentes (es decir, la proteína portadora, el anticuerpo y, opcionalmente, el agente terapéutico) en la solución. En una modalidad, la K_d de las nanopartículas es de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 2×10^{-5} M. En una modalidad, la K_d de las nanopartículas es de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 2×10^{-8} M. En una modalidad, la K_d de las nanopartículas es de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 7×10^{-9} M. En una modalidad preferida, la K_d de las nanopartículas es de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 3×10^{-8} M. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos mencionados, incluidos los extremos.

Liofilización

Las composiciones liofilizadas de la presente invención se preparan mediante técnicas de liofilización estándar con o sin presencia de estabilizantes, amortiguadores, etc. Sorprendentemente, estas condiciones no alteran la estructura relativamente frágil de las nanopartículas. Además, como máximo, estas nanopartículas conservan su distribución de tamaño tras la liofilización y, lo que es más importante, se pueden reconstituir para administración *in vivo* (p. ej.,

administración intravenosa) sustancialmente de la misma forma y en las mismas proporciones que si se prepararan nuevas.

Formulaciones

En un aspecto, la composición de nanopartículas se formula para inyección directa en un tumor. La inyección directa incluye inyección en o próxima a un sitio de tumor, perfusión en un tumor y similares. Como la composición de nanopartículas no se administra sistémicamente, se formula una composición de nanopartículas para inyección directa en un tumor que puede comprender cualquier tamaño de partícula promedio. Sin pretender limitarse por la teoría, se cree es más probable que las partículas más grandes (p. ej., mayores de 500 nm, mayores de 1 μ m y similares) se inmovilicen dentro del tumor, proporcionando así lo que se cree que es un mayor efecto beneficioso.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una composición que comprende un compuesto proporcionado en la presente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En general, los compuestos proporcionados en la presente se pueden formular para administración a un paciente mediante cualquiera de los modos aceptados de administración. En la técnica hay diversas formulaciones y sistemas de administración de fármacos disponibles. Véase, p. ej.,

Gennaro, A.R., ed. (1995) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18° ed., Mack Publishing Co.

En general, los compuestos proporcionados en la presente serán administrados como composiciones farmacéuticas mediante
5 cualquiera de las siguientes vías: oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal o mediante supositorio) o parenteral (por ejemplo, administración intramuscular, intravenosa o subcutánea).

En líneas generales, las composiciones están hechas de un
10 compuesto de la presente invención en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes aceptables no son tóxicos, ayudan a la administración y no afectan de manera negativa el beneficio terapéutico de los compuestos reivindicados. Dicho excipiente
15 puede ser cualquier sólido, líquido, semisólido o, en caso de una composición en aerosol, excipiente gaseoso que, en general, se encuentra disponible para un experto en la técnica.

Los excipientes farmacéuticos sólidos incluyen almidón,
20 celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche descremada y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos se pueden seleccionar de glicerol,

propilenglicol, agua, etanol y varios aceites, los que incluyen aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. Los portadores
5 líquidos preferidos, en particular para soluciones inyectables, incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles. Otros excipientes farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, editado por E. W. Martin (Mack Publishing Company,
10 18.^a ed., 1990).

Las presentes composiciones, si se desea, pueden presentarse en un envase o un dispositivo dispensador que contiene una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. Dicho paquete o dispositivo puede
15 comprender, por ejemplo, una hoja de metal o plástica, como un envase de burbujas o vidrio y tapas de goma como en los frascos. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado por instrucciones para su administración. Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención
20 formuladas en un vehículo farmacéuticamente compatible, también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada.

Métodos de tratamiento

Las composiciones de nanopartículas descritas en la presente son útiles para tratar células de cáncer y/o tumores en un mamífero. En una modalidad preferida, el mamífero es un ser humano (es decir, un paciente humano). Preferentemente, la
5 composición de nanopartículas liofilizadas se reconstituye (se suspende en un excipiente acuoso) antes de la administración.

En un aspecto se proporciona un método para tratar una célula de cáncer, el cual método comprende poner en contacto la
10 célula con una cantidad eficaz de una composición de nanopartículas descrita en la presente para tratar la célula de cáncer. El tratamiento de una célula de cáncer incluye, entre otros, reducción de la proliferación, destrucción de la célula, prevención de la metástasis de la célula y similares.

15 En un aspecto, se proporciona un método para tratar un tumor en un paciente que lo necesita, el cual método comprende administrarle al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de nanopartícula según se describe en la presente para tratar el tumor. En una modalidad, el
20 tamaño del tumor se reduce. En una modalidad, el tamaño del tumor no aumenta (es decir, avanza) durante al menos un período durante y/o después del tratamiento.

En una modalidad, la composición de nanopartícula se administra por vía intravenosa. En una modalidad, la

composición de nanopartículas se administra directamente al tumor. En una modalidad, la composición de nanopartícula se administra por inyección directa o perfusión en el tumor.

En una modalidad, el método comprende:

- 5 a) administrar la composición de nanopartícula una vez por semana durante tres semanas;
 - b) detener la administración de la composición de nanopartícula durante una semana; y
 - c) opcionalmente repetir las etapas a) y b) según sea
- 10 necesario para tratar el tumor.

En una modalidad, la cantidad terapéuticamente eficaz de las nanopartículas descritas en la presente comprende entre aproximadamente 50 mg/m² y aproximadamente 200 mg/m² de proteína portadora o proteína portadora y agente terapéutico.

- 15 En una modalidad preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 75 mg/m² y aproximadamente 175 mg/m² de proteína portadora o proteína portadora y agente terapéutico. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de
- 20 cualquiera de los intervalos mencionados, incluidos los extremos.

En una modalidad, la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 20 mg/m² y aproximadamente 90 mg/m² del anticuerpo. En una modalidad preferida, la cantidad

terapéuticamente eficaz comprende entre 30 mg/m² y aproximadamente 70 mg/m² de anticuerpo. Los valores contemplados incluyen cualquier valor, subintervalo o intervalo dentro de cualquiera de los intervalos mencionados, 5 incluidos los extremos.

Los cánceres o tumores que se pueden tratar con las composiciones y métodos descritos en la presente incluyen, entre otros: cáncer del tracto biliar; cáncer de cerebro, incluido glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de mama; 10 cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer de esófago, cáncer gástrico; neoplasias hematológicas, incluido leucemia mielógena y linfocítica aguda; mieloma múltiple; leucemias asociadas al SIDA y linfoma leucemia de células T en adultos; neoplasias 15 intraepiteliales, incluido enfermedad de Bowen y enfermedad de Paget; cáncer de hígado (hepatocarcinoma); cáncer de pulmón; linfomas, incluido enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer oral, incluido carcinoma de células escamosas; cáncer de ovario, incluido aquellos que 20 derivan de las células epiteliales, células estromales, células germinales y células mesenquimales; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer rectal; sarcomas, incluido leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel, incluido

melanoma, sarcoma de Kaposi, cáncer basocelular y cáncer de células escamosas; cáncer de testículos, incluidos tumores germinales (seminoma, no seminoma[teratomas, coriocarcinomas]), tumores estromales y tumores de células germinales; cáncer de tiroides, incluido adenocarcinoma de tiroides y carcinoma medular; y cáncer renal incluido adenocarcinoma y tumor de Wilms. En modalidades importantes, los cánceres o tumores incluyen cáncer de mama, linfoma, mieloma múltiple y melanoma.

En general, los compuestos de la presente invención serán administrados en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante cualquiera de las vías de administración aceptadas para agentes que tienen utilidades similares. La cantidad real del compuesto de la presente invención, es decir, las nanopartículas, dependerá de diversos factores, tales como la gravedad de la enfermedad a ser tratada, la edad y salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto utilizado, la vía y forma de administración y otros factores conocidos por el experto en la técnica.

Una cantidad eficaz de dichos agentes se puede determinar fácilmente mediante la experimentación de rutina, así como la vía más eficaz y conveniente de administración y la formulación más adecuada. En la técnica hay diversas formulaciones y sistemas de administración de fármacos

disponibles. Véase, p. ej., Gennaro, A.R., ed. (1995) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18° ed., Mack Publishing Co.

Una cantidad eficaz o una cantidad terapéuticamente eficaz o
5 dosis de un agente, p. ej., un compuesto de la invención, se
refiere a una cantidad del agente o compuesto que produce una
mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia
en un sujeto. La toxicidad y la eficacia terapéutica de
dichas moléculas puede determinarse mediante procedimientos
10 farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales
experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la
dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis
terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La
proporción de la dosis de los efectos tóxicos y terapéuticos
15 es el índice terapéutico y puede expresarse como la
proporción DL50/DE50. Se prefieren los agentes que exhiben
índices terapéuticos altos.

La cantidad eficaz o cantidad terapéuticamente eficaz es la
cantidad del compuesto o composición farmacéutica que
20 provocará la respuesta biológica o médica de un tejido,
sistema, animal o humano, buscada por el investigador, el
veterinario, el doctor u otro médico clínico. La dosificación
puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la
forma de dosificación empleada y/o la vía de administración

utilizada. La formulación exacta, la vía de administración, la dosificación y el intervalo de dosificación se elegirán de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, teniendo presentes los detalles de la afección del sujeto.

5 La cantidad y el intervalo de dosificación se podrán ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que es suficiente para lograr los efectos deseados; es decir, la concentración mínima efectiva (MEC). La MEC variará para cada compuesto pero se podrá estimar a
10 partir, por ejemplo, de datos *in vitro* y experimentos en animales. Las dosificaciones necesarias para alcanzar la MEC dependerán de características individuales y la vía de administración. En casos de administración local o absorción selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede
15 no estar relacionada con la concentración plasmática.

EJEMPLOS

La presente descripción se ilustra utilizando nanopartículas compuestas de paclitaxel unido a albúmina (es decir,
20 Abraxane®) o cisplatino como núcleo y bevacizumab (es decir, Avastin®) o Rituximab (es decir, Rituxan®) como anticuerpos. El experto en la técnica comprenderá que la fabricación y uso de las nanopartículas de los ejemplos solo tienen fines ilustrativos y que la presente descripción no está limitada

por esta ilustración.

Cualquier abreviatura utilizada en la presente tiene el significado científico normal. Todas las temperaturas están en °C a menos que se indique lo contrario. En la presente,
 5 los siguientes términos tienen los siguientes significados salvo que se defina lo contrario:

ABX	=	Abraxane®/(paclitaxel unido a albúmina)
AC	=	ABX unido a cisplatino
ACN	=	acetonitrilo
ADC	=	quimioterapia dependiente de anticuerpo
BEV	=	bevacizumab
BSA	=	albúmina de suero bovino
dH ₂ O	=	agua destilada
DMEM	=	medio de Eagle modificado con Dulbecco
nM	=	nanomolar
EdU	=	5-etinil-2'-desoxiuridina
EM	=	microscopía electrónica
FCB	=	amortiguador de citometría de flujo
FITC	=	fluoresceína
kD	=	kilo-dalton
K _d	=	constante de disociación
kg	=	kilogramo
KV	=	kilo-voltios
L/h	=	litro/hora

LC-MS	=	cromatografía líquida-espectrometría de masas
M	=	molar
mCi	=	milicurios
mg	=	miligramo
ml o mL	=	mililitro
m ²	=	metros cuadrados
mm ³	=	milímetro cúbico
µg	=	microgramo
µl	=	microlitro
µm	=	micrómetro/micron
PBS	=	solución salina amortiguada con fosfato
pK	=	farmacocinética
TA	=	temperatura ambiente
rpm	=	rotaciones por minuto
V	=	voltios
x g	=	veces la gravedad

Ejemplo 1: preparación de nanopartículas

Se suspendió abraxane (ABX) (10 mg) en bevacizumab (BEV) (4 mg [160 µl] a menos que se indique algo diferente) y se
5 añadieron 840 µl de 0,9 % de solución salina para obtener una concentración final de 10 mg/ml y 2 mg/ml de ABX y BEV, respectivamente. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a

temperatura ambiente (o a la temperatura indicada) para permitir la formación de partículas. Para los experimentos de Mastersizer para medir el tamaño de partícula de los complejos de ABX:BEV, se suspendieron 10 mg de ABX en BEV a 5 concentraciones de entre 0 y 25 mg/ml. Se formaron complejos de ABX con rituximab (0-10 mg/ml) o trastuzumab (0-22 mg/ml) en condiciones similares.

Para utilizar en humanos, los complejos de ABX:BEV se pueden preparar obteniendo la cantidad adecuada de dosis de 10 recipientes de 4 mL de 25 mg/mL BEV y diluyendo cada recipiente según las siguientes indicaciones hasta 4 mg/mL. La cantidad adecuada de dosis de recipientes de 100 mg de ABX se puede preparar mediante reconstitución hasta una concentración final que contiene 10 mg/mL de nanopartículas 15 de ABX. Utilizando una jeringa de 3 mL estéril, se pueden retirar 1,6 mL (40 mg) de bevacizumab (25 mg/mL) e inyectar lentamente durante un mínimo de 1 minuto a la pared interna de cada uno de los recipientes que contienen 100 mg de ABX. La solución de bevacizumab no se debe inyectar directamente a 20 la torta liofilizada ya que esto producirá formación de espuma. Después, utilizando una jeringa estéril de 12 mL, 8,4 mL de inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP, se puede retirar e inyectar lentamente, durante un mínimo de 1 minuto, 8,4 mL en la pared interna de cada recipiente que contiene

ABX 100 mg y BEV 40 mg. Después del añadido de BEV 1,6 mL e
inyección de cloruro de sodio al 0,9 %, USP 8,4 mL se
completa, cada recipiente se puede agitar suavemente y/o
invertir lentamente durante al menos 2 minutos hasta una
5 disolución completa de cualquier torta/polvo que se produzca.
Se debe evitar la generación de espuma. En este momento, la
concentración de cada recipiente debe ser de 100 mg/10 mL ABX
y 40 mg/10 mL BEV. Los recipientes que contienen el ABX y BEV
deben dejarse reposar durante 60 minutos. Los recipientes se
10 deben agitar suavemente y/o invertir cada 10 minutos para
continuar mezclando el complejo. Después de 60 minutos, el
volumen de dosificación calculado de ABX y BEV se debe
retirar de cada recipiente y añadir lentamente a una bolsa
viaflex vacía. Un volumen igual de 0,9 % de inyección de
15 cloruro de sodio, USP se añade para obtener la concentración
final de ABX 5 mg/mL y BEV 2 mg/mL. La bolsa se debe agitar
suavemente y/o invertir lentamente durante 1 minuto para
mezclar. Las nanopartículas de ABX:BEV se pueden almacenar
durante hasta 4 horas a temperatura ambiente después de la
20 dilución final.

Ejemplo 2: unión de ABX y BEV in vitro

Para determinar si ABX y BEV interactúan, se analizaron las
nanopartículas formadas en el ejemplo 1 mediante citometría
de flujo y microscopía de electrones.

Métodos

Citometría de flujo: se produjo AB160 como se describió en el ejemplo 1 arriba. Para determinar la unión de BEV con ABX, se realizó visualización de AB160 en un citómetro de flujo
5 Accuri C6 (BD Franklin Lakes, NJ) y el análisis de los datos se realizó utilizando el software Accuri C6. Se etiquetó IgG antirratón de cabra biotinilada (5 µg) (Abcam, Cambridge, MA) con 5 µg de estreptavidina PE (Abcam, Cambridge, MA). Se eligió IgG antirratón de cabra para etiquetar AB160 porque la
10 parte Fab de BEV es derivada de ratón. Se incubaron ABX y AB160 con IgG antirratón de cabra etiquetada con PE durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y se visualizaron mediante citometría de flujo.

Microscopía electrónica: se añadieron µl ABX, disuelto en PBS
15 a 6 mg/ml, a una rejilla de cobre recubierta con parlodian-carbono de 300-mesh y se dejó reposar durante 1 minuto. Un trozo puntiagudo de papel de filtro tocó la gota para retirar el exceso de líquido, dejando una película fina en la rejilla. Se dejaron secar las regillas. Para disolver los
20 cristales de amortiguador que quedaron en la rejilla seca, se lavó la muestra tres veces en dH₂O. Una pequeña gota de 1 % de ácido fosfotúngstico (PTA), pH 7,2, se añadió a la rejilla. La rejilla se tocó nuevamente con un trozo puntiagudo de papel de filtro para retirar el exceso de

líquido, dejando una película fina en la rejilla y se dejó secar. Se diluyó BEV (Genentech) a 25 mg/ml en solución de cloruro de sodio al 0,9 % con PBS con una proporción de 1:10. Se cargaron cinco μ l de BEV sobre una rejilla recubierta con formvar de níquel y se dejaron secar al aire durante 30 minutos a 1 hora. Para AB160, 10 mg/ml ABX, disuelto en PBS y 4 mg/ml de BEV, en solución de cloruro de sodio al 0,9 %, se mezclaron con una proporción de 2,5:1. Se diluyó adicionalmente el complejo con PBS a 1:5. Se cargaron cinco μ l del complejo sobre una rejilla recubierta con formvar de níquel y se secaron al aire durante 30 minutos a 1 hora. Se incubaron ambas muestras durante 1 hora en IgG antirratón de cabra con 6 nm de partículas conjugadas con oro (Electron Microscopy Sciences), se diluyeron 1:30 con 10 % de FCB/PBS, se lavaron 6 veces con PBS (cada 2 minutos), 6 veces con dH_2O , después se tiñeron con la mezcla de 2 % de metilcelulosa y 4 % de UA (9:1) durante 5 minutos. Se utilizó papel de filtro para drenar la mancha y la rejilla se secó al aire durante 1 hora. Se incubaron ambas muestras durante la noche en IgG antirratón de asno con 6 nm de partículas conjugadas con oro (Jackson ImmunoResearch) diluido 1:25 con 10 % de FCB/PBS, se lavaron 6 veces con PBS (cada 2 minutos), 6 veces con agua dH_2O , se tiñeron con 1 % de PTA durante 5 minutos, se secaron al aire, se cubrieron con 2 % de

metilcelulosa y se secaron al aire durante 1 hora. Se tomaron las micrografías en un JEOL1400 funcionando a 80 KV.

Resultados

Se coincubó ABX (10 mg/ml) con 4 mg/ml de BEV *in vitro* y se descubrió que se formaron nanopartículas de 160 nm (denominadas en la presente AB160). Como la parte Fab del IgG1 (BEV) es de origen de ratón, las partículas que contenían BEV se etiquetaron de forma selectiva con IgG antirratón de cabra purificada seguido de PE anticabra como anticuerpo secundario. Como control negativo, se tiñeron las muestras con el PE anticabra solamente. Se visualizaron las partículas mediante citometría de flujo y demostraron una señal brillante de IgG1 antirratón unida a AB160 (41,2 % positivo) con respecto a ABX (6,7 % positivo) solo (figura 1A). Para validar la unión de BEV con ABX, se etiquetaron los BEV con IgG antihumana de ratón etiquetada con oro y se visualizaron las partículas con microscopía de electrones (figura 1B). Sorprendentemente, las imágenes de EM sugieren una monocapa de BEV que rodea las nanopartículas de ABX.

Para determinar a qué proteína (albúmina o BEV) permanece unido el paclitaxel cuando el complejo se descompone, se produjeron AB160 y se recogieron fracciones: el particulado (nanoAB160), proteínas de más de 100 kD y proteínas de menos de 100 kD. Se midió el Paclitaxel en cada fracción mediante

cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Aproximadamente el 75 % del paclitaxel permaneció dentro del particulado y la mayoría del paclitaxel restante se asoció con la fracción que contenía proteínas de 100 kD o mayores (figura 1C, arriba), lo que sugiere que cuando el particulado se disocia el paclitaxel está unido a BEV solo o a un heterodímero de BEV y albúmina. Esto indica que los complejos disociados contienen el fármaco de quimioterapia con el anticuerpo, lo que aun así se desplazaría al microentorno tumoral de VEGF alto. Estos hallazgos se confirmaron mediante análisis de transferencia Western de los sobrenadantes de AB160, que mostraron que BEV y paclitaxel se colocan a aproximadamente 200 kD, un tamaño que coincide con un complejo de proteína de paclitaxel-BEV-albúmina (figura 1C, abajo).

Ejemplo 3: función de AB160 in vitro

Se demostró la confirmación de que los dos elementos clave en los complejos, el anticuerpo y el paclitaxel, mantuvieron su función cuando estaban presentes en los complejos.

20 **Métodos**

Toxicidad in vitro: se cultivaron la línea celular de melanoma humano A375 (ATCC Manassa, VA) y la línea de linfoma de células B Daudi (ATCC Manassa, VA) en DMEM con 1 % de PSG y 10 % de FBS. Se recolectaron las células y se colocaron en

placas a $0,75 \times 10^6$ células por pocillo en placas de 24 pocillos. Se expusieron las células a ABX o AB160 con concentraciones de paclitaxel de 0 a 200 $\mu\text{g/ml}$ durante la noche a 37°C y 5 % de CO_2 . Para medir la proliferación, se
5 utilizó el kit Click-iT EdU (Molecular Probes, Eugene, OR). En resumen, se añadió EdU 10 mM a los pocillos y se incubó durante la noche con las células y ABX o AB160. Se permeabilizaron las células con 1 % de saponina y se etiquetó el EdU intercalado con un anticuerpo conjugado con FITC. Se
10 determinó el índice de proliferación dividiendo las células positivas para FITC de cada tratamiento entre la proliferación máxima de las células etiquetadas con EdU no tratadas.

ELISA de VEGF: para determinar si BEV se puede unir a su
15 ligando, VEGF, cuando está unido a ABX, se empleó un ELISA de VEGF estándar (sistemas R y D, Minneapolis, MN). Se preparó AB160 como se describió y se añadieron 2000 pg/ml de VEGF al complejo de AB160 o ABX solo. Se incubó VEGF con las nanopartículas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se
20 centrifugó la suspensión a 6000 rpm durante 15 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se midió VEGF libre con ELISA. En resumen, se recubrieron las placas de ELISA con anticuerpo de captura durante la noche a 4°C . Se lavaron las placas, se bloquearon y se les añadieron estándares y muestras. Después

del lavado, se añadió anticuerpo de detección y se desarrollaron las placas con sustrato (sistemas R y D, Minneapolis, MN). Se midió la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas Versamax ELISA (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se determinó la concentración de VEGF no unido con una curva estándar de 0 a 2000 pg/ml.

Resultados

AB160 tiene toxicidad similar con respecto a ABX solo en un ensayo de toxicidad *in vitro* con la línea celular de melanoma humano, A375, lo que sugiere que el paclitaxel funciona de igual forma en cualquier formulación (figura 1D).

Para evaluar la unión de VEGF a BEV en el complejo de AB160, se coincubaron AB160 o ABX con VEGF, se retiró el particulado y se evaluó el sobrenadante en cuanto al contenido de VEGF. La falta de VEGF en el sobrenadante medida a partir de AB160 (<10 % VEGF no unido) indicó que el VEGF estaba unido por el BEV en el complejo de AB160, mientras que permaneció libre cuando se incubó con ABX (>80 % VEGF no unido) solo (figura 1E).

Cabe destacar que estos ensayos demostraron que el paclitaxel en AB160 mantiene su toxicidad a las células tumorales y el BEV unido mantiene la capacidad de unirse a su ligando, VEGF.

Ejemplo 4: tamaño de partícula y afinidad de proteína

Para comprender las características de las nanopartículas

formadas cuando se une BEV con ABX, se determinó el tamaño de los complejos de ABX:BEV con respecto a ABX.

Métodos

Mastersizer y Nanosight: el tamaño de partícula de ABX y los complejos de anticuerpo-fármaco ABX se midió mediante dispersión de luz dinámica en un Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Westborough, MA). Para medir el tamaño de partícula, se añadieron 2 ml (5 mg/ml) de Abraxane o complejo a la cámara de muestra. Se analizaron los datos con el software Malvern y se mostraron las distribuciones de tamaño de partícula por volumen. Los tamaños de partícula y la estabilidad se validaron más adelante utilizando el sistema Nanosight (Malvern Instruments, Westborough, MA). Las partículas de ABX o complejo se diluyeron hasta el intervalo adecuado para medir adecuadamente los tamaños de partícula. Se mostraron los datos mediante distribución de tamaño de partícula; sin embargo, el análisis de rastreo de nanopartículas utiliza el movimiento browniano para determinar el tamaño de partícula.

Ensayo de unión: se unieron BEV biotinilado, rituximab o trastuzumab a 100 µg/ml a la sonda de estreptavidina (ForteBio Corp. MenloPark, CA). Se midió la unión de ABX mediante absorbancia de luz en el sistema BLItz (ForteBio Corp. MenloPark, CA) a 1000, 500 y 100 mg/ml. Se calcularon

las constantes de asociación y disociación utilizando el software BLItz.

Se utilizó tecnología de Interferometría de Bio-Capa (BLItz) para evaluar la afinidad de unión de BEV con ABX. El BEV biotinilado se unió a la sonda de estreptavidina y se expuso a ABX (1000, 500 y 100 $\mu\text{g/ml}$). La constante de disociación (K_d) de BEV y ABX es $2,2 \times 10^{-8}$ M a temperatura ambiente y pH 7, lo que coincide con una interacción no covalente fuerte. La afinidad de unión de BEV y ABX se encuentra dentro del intervalo de las constantes de disociación observadas entre la albúmina y los dominios de unión a albúmina modificados genéticamente o naturales de algunas proteínas bacterianas. Nilvebrant, J. et al. (2013) *Comput Struct Biotechnol J* 6:e201303009.

15 Resultados

Las nanopartículas de ABX:BEV fueron consistentemente mayores (aproximadamente 160 nm) que los 130 nm de ABX solo (figura 2a). El tamaño de la nanopartícula creada directamente se correlacionó con la concentración de BEV utilizada, con tamaños medianos que oscilan entre 0,157 y 2,166 μm . (figura 2A). Como el objetivo de estos estudios es un ensayo clínico de fase I, se centró en la partícula de ABX:BEV más pequeña (AB160) porque es la más similar a 130 nm ABX. El tamaño de la partícula de AB160 coincidió con ABX más una monocapa de

BEV que lo rodeaba y con la imagen EM de la partícula (véase la figura 1B).

Para determinar si las condiciones de administración intravenosa afectan las distribuciones de tamaño de nanopartícula, se evaluaron las distribuciones de tamaño de partícula de AB160 (o ABX) incubado en solución salina durante hasta 24 horas a temperatura ambiente. La distribución de tamaño de AB160 no cambia significativamente durante hasta 24 horas (figuras 9A y 9B). Sin embargo, en 4 horas a temperatura ambiente, aparece algo de evidencia de descomposición de AB160 con ELISA (figura 9C).

Para determinar la estabilidad de AB160 en plasma, se incubaron ABX o AB160 en solución salina o plasma humano heparinizado con proporciones de volumen relativo de 9:1 o 1:1. Cabe destacar que no se detectaron partículas (0,01 a 1 μm) cuando ABX (figura 10, panel superior) o AB160 (figura 10, panel inferior) se incubaba en plasma en volúmenes iguales (1:1).

El análisis de transferencia Western (no se muestran los datos) indicó que, en solución salina o plasma humano heparinizado, el AB160 se disoció en conjugados de proteína más pequeños que contenían el anticuerpo dirigido al tumor, albúmina y el agente citotóxico, paclitaxel. Estos conjugados de proteína conservan su capacidad de dirigirse al tumor y,

una vez que se encuentran en el sitio del tumor, pueden disolverse rápidamente y liberar la carga útil citotóxica para iniciar eficazmente la regresión tumoral sin interiorización de la nanopartícula completa por las células
5 tumorales.

A continuación, se suspendió ABX en BEV y se diluyó la mezcla con solución salina a pH 3, 5, 7 o 9 antes de la incubación a diferentes temperaturas (TA, 37 °C y 58 °C) para permitir la formación de partículas con el fin de evaluar si la afinidad
10 de unión dependía del pH y/o de la temperatura. La afinidad de unión de ABX y BEV depende del pH y de la temperatura, con una mayor afinidad de unión observada cuando las partículas se forman a pH 5 y 58 °C (figura 2B).

Para determinar si la mayor afinidad de unión de BEV y ABX a
15 58 °C y pH 5 se traduce en estabilidad del complejo, se compararon diversas preparaciones mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanosight). La estabilidad de AB160 preparado a 58 °C y pH 5 (AB1600558), temperatura ambiente y pH 7 (AB16007) o 58 °C y pH 7 (AB1600758) se
20 comparó con ABX expuesto a las mismas condiciones (ABX0558, ABX07 y ABX0758, respectivamente) después de la incubación en suero AB humano durante 0, 15, 30 o 60 minutos.

Las partículas preparadas en condiciones de la afinidad de unión más alta (pH 7 y 58 °C) también fueron más estables,

según lo indicado por la cantidad de partículas presentes por mg ABX después de la exposición a suero AB humano. Las partículas de AB160 mostraron mayor estabilidad en suero humano que se correlacionó con sus afinidades de unión. En particular, AB16007 y AB1600558 fueron más estables en solución salina y en suero humano que ABX solo, según lo determinado por el tamaño y la cantidad de partículas medidos por mg ABX (figura 2C y tabla 3). Esto muestra que la estabilidad de las partículas de AB160 se puede manipular cambiando las condiciones en las cuales se forman las partículas de AB160.

Tabla 3: estabilidad de AB160 y ABX en suero AB humano

	Solución salina	Suero AB humano			
		0 min	15 min	30 min	60 min
ABX07	221,5	54,4	85,2	84	32,1
AB16007	2500	516	508	756	296
ABX0758	236	182,4	155,4	54	66
AB1600758	2460	436	236	260	176
ABX0558	348	510	86,8	90	64
AB1600558	7296	2200	1224	1080	960

Partículas por mg ABX x 10^8

Estos datos demuestran que BEV se une a ABX con una afinidad en el intervalo picomolar, lo que indica un enlace no covalente fuerte y demuestran una distribución de tamaño de partícula que coincide con ABX rodeado por una monocapa de moléculas de anticuerpo; el tamaño de las partículas creadas depende de la concentración de anticuerpo.

Ejemplo 5: eficacia de AB160 en ratones

Se empleó un modelo de xenoinjerto de células de melanoma humano A375 implantadas en ratones lampiños atímicos para evaluar la eficacia de AB160 *in vivo*.

Métodos

5 Se realizaron experimentos *in vivo* al menos 2 veces. Se determinó la cantidad de ratones necesarios para esos experimentos mediante análisis de potencia. Se midieron los tumores de los ratones 2-3 veces/semana y se sacrificaron los ratones cuando el tumor alcanzaba el 10 % en peso. Los
10 ratones que presentaron respuestas tumorales completas se monitorizaron durante 60-80 días después del tratamiento. El criterio de valoración de los estudios en ratones fue la supervivencia mediana. Se generaron curvas de Kaplan-Meier y se realizó la prueba de Mantle-Cox para determinar la
15 significancia de la supervivencia media entre los grupos de tratamiento. Los resultados *in vitro* presentados representan al menos 5 experimentos repetidos. Los análisis estadísticos del cambio porcentual *in vitro* e *in vivo* desde el inicio se realizaron utilizando la prueba t de Student.

20 Modelo de ratón: para evaluar la eficacia tumoral, se implantaron 1×10^6 de células de melanoma humano A375 en el flanco derecho de ratones lampiños atímicos (Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN). Cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 700 mm³, se

aleatorizaron los ratones y se trataron con PBS, ABX (30 mg/kg), BEV (12 mg/kg), BEV seguido de ABX o AB160 con las concentraciones anteriores. Para los experimentos de ratones evaluando partículas de AB más grandes, se utilizó la mayor

5 dosis de BEV (45 mg/kg) necesaria para crear mayores partículas en el grupo de tratamiento solo de BEV. Se monitorizó el tamaño de tumor 3 veces/semana y se calcularon los volúmenes tumorales con la siguiente ecuación: $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$. Se sacrificaron los ratones cuando el

10 tamaño del tumor igualó al 10 % del peso corporal del ratón o aproximadamente 2500 mm³. Se calculó el cambio porcentual en el día 7 desde el inicio del siguiente modo: $[(\text{tamaño del tumor en el día del tratamiento} - \text{tamaño del tumor en el día 7}) / \text{tamaño del tumor en el día del tratamiento}] \times 100$. La

15 evaluación *in vivo* del AB160 fue similar, con la diferencia de que se inyectaron 5×10^6 células Daudi en el flanco derecho de ratones lampiños atímicos.

Resultados

Se evaluaron AB160 con respecto a PBS, los fármacos únicos

20 solos y los fármacos administrados secuencialmente. Los ratones tratados con AB160 presentaron un tamaño de tumor reducido significativamente en comparación con todos los otros grupos de tratamiento ($p=0,0001$ a $0,0089$) en el día 7 después del tratamiento, con respecto al inicio (figura 3A).

Los tumores en todos los ratones tratados con AB160 y con regresión en el día 7 y esta respuesta tumoral se tradujo en una supervivencia mediana con un aumento significativo del grupo AB160 con respecto a todos los otros grupos (figura 3B), con una supervivencia de 7, 14, 14, 18 y 33 días para los grupos de PBS ($p < 0,0001$), BEV ($p = 0,003$), ABX ($p = 0,0003$), BEV + ABX ($p = 0,0006$) y AB160, respectivamente.

Es probable que los tumores más grandes tengan una mayor concentración de VEGF local. Cuando se analizaron los datos basándose en el tamaño del tumor en el día del tratamiento ($< 700 \text{ mm}^3$ y $> 700 \text{ mm}^3$), se demostró que los tumores más grandes tenían una mayor respuesta a AB160, lo que sugiere que una mayor concentración de VEGF tumoral atrae más ABX dirigido a BEV al tumor. La diferencia en el cambio porcentual desde el inicio fue significativa para los grupos de AB160 ($p = 0,0057$). Esta observación no se realizó solamente en el grupo de ABX ($p = 0,752$), en donde el ABX no tiene capacidad de direccionamiento (figura 3C).

Se prepararon partículas de tamaño creciente utilizando proporciones crecientes de BEV:ABX como se muestra en la figura 2A. La regresión tumoral y la supervivencia mediana se correlacionan de forma positiva con un tamaño de partícula creciente, lo que indica que la biodistribución de partículas más grandes se puede alterar con respecto a las más pequeñas

(figuras 3D y 3E). Se realizaron estudios de toxicidad completos a los ratones y no se observaron toxicidades.

Ejemplo 6: Farmacocinética de paclitaxel en ratones

Para comparar la farmacocinética (pk) de AB160 y ABX, se midieron concentraciones de paclitaxel en plasma en ratones que recibieron AB160 o ABX a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas.

Métodos

Farmacocinética de paclitaxel: La separación cromatográfica de líquido de paclitaxel y d5 paclitaxel se lograron utilizando una precolumna Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,1 x 5 mm, 2,7 μ m, Chrom Tech, Apple Valley, MN) unida a una columna analítica Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 μ m Chrom Tech, Apple Valley, MN) a 40 °C, eluido con una fase móvil de gradiente compuesta por agua con 0,1 % de ácido fórmico (A) y ACN con 0,1 % de ácido fórmico (B) con una velocidad de flujo constante de 0,5 ml/minuto. Se inició la elución a 60 % de A y 40 % de B durante 0,5 minutos, después B se aumentó linealmente de 40-85 % durante 4,5 minutos, se mantuvo a 85 % B durante 0,2 minutos y retornó a las condiciones iniciales durante 1,3 minutos. La temperatura del automuestreador fue de 10 °C y el volumen de inyección de muestra fue de 2 μ l. La detección de paclitaxel y el estándar interno d5-paclitaxel se lograron utilizando el espectrómetro de masa en modo ESI positivo con voltaje capilar 1,75 kV,

temperatura de fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo de gas de cono 150 L/h, flujo de gas de desolvatación 1000 L/h, utilizando modo de escaneo de monitorización de reacción múltiple (MRM) con un tiempo de permanencia de 0,075 segundos. Se determinaron los voltajes de cono y las energías de colisión mediante el software MassLynx-Intellistart, v4.1 y se variaron entre 6-16 V y 12-60 eV, respectivamente. El precursor de MRM y los iones de producto se monitorizaron a m/z 854,3>105,2 para el paclitaxel y 859,3>291,2 para el d5 paclitaxel. Las soluciones madre primarias de paclitaxel (1 mg/ml en EtOH) y d5 paclitaxel (1 mg/ml en EtOH) se prepararon en recipientes de vidrio silanizados color ámbar de 4 ml y se almacenaron a -20 °C. Se prepararon estándares de trabajo mediante dilución de la solución madre con ACN en recipientes de vidrio silanizados color ámbar de 2 ml y se almacenaron a -20 °C. Las muestras de plasma se extrajeron del siguiente modo, se añadieron 100 µl de muestra de plasma a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml que contenía d5 paclitaxel (116,4 nM o 100 ng/ml) y 300 µl de ACN, se agitaron en vórtex, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para precipitar las proteínas y se centrifugaron (14.000 rpm) durante 3 minutos. Se filtró el sobrenadante en una placa Agilent Captiva ND^{lípidos} (Chrom Tech, Apple Valley, MN), se

recogieron en una placa de 96 pocillos profunda y se secaron utilizando gas nitrógeno. Se reconstituyeron las muestras utilizando 100 μ l de ACN y se agitaron en un agitador de placas (velocidad alta) durante 5 minutos. Se prepararon 5 curvas estándar de plasma diariamente que contenían paclitaxel (0,59-5855 nM o 0,5-5000 ng/ml) y d5 paclitaxel (116,4 nM) para la cuantificación de paclitaxel. Se descongelaron los tumores de ratón sobre hielo, se pesaron y se diluyeron en 2 partes (peso a volumen) en 1x PBS. Se 10 homogeneizaron los tumores utilizando un homogenizador de tejido PRO200 utilizando la sonda de diente de sierra (5 mm x 75 mm). Se procesó el homogenado de tumor de la misma forma que las muestras de plasma humano.

Imagenología de ratón: se prepararon soluciones de control de 15 IgG y avastin y se etiquetaron con I-125 según el protocolo (Imanis Life Sciences). En resumen, Tris Buffer (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,15 M NaCl) y 5 mCi Na¹²⁵I se añadieron directamente a tubos de yodación (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA). Se dejó que el yodo se activara y se agitó a 20 temperatura ambiente. Se mezcló el yodo activado con la solución de proteína. Se añadieron 50 μ l de amortiguador de depuración (10 mg tirosina/mL en PBS, pH 7,4) y se incubaron durante cinco minutos. Después del añadido de amortiguador de Tris/BSA y mezcla, se aplicaron las muestras en casetes de

diálisis MWCO 10K contra PBS preenfriado durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas y durante la noche a 4 °C. Se determinó la radioactividad utilizando un contador Gamma, después se calcularon las desintegraciones por minuto (DPM) y la actividad específica. Se inyectaron ratones en la vena de la cola con Avastin I-125, Abraxane-Avastin I-125, Abraxane-IgG humana I-125 o Abraxane solo. Se obtuvieron imágenes de los animales 3, 10, 24 y 72 horas después de la administración mediante imagenología SPECT-CT utilizando el escáner U-SPECT-II/CT (MILabs, Utrecht, Países Bajos). Se realizó la reconstrucción por SPECT utilizando un algoritmo POSEM (subgrupos ordenados pixelados por maximización de expectativas). Se reconstruyeron los datos CT durante el algoritmo Feldkamp. Se obtuvieron adicionalmente imágenes coregistradas y se visualizaron utilizando el software PMOD (PMOD Technologies, Zúrich, Suiza). Se sacrificaron los animales y se disecaron 72 horas después de la inyección. Se midieron tejidos y órganos seleccionados de interés utilizando calibrador de dosis de radioisótopo (Capintec CRC-127R, Capintec Inc.).

Resultados

Los resultados del primer experimento pk se proporcionan en las figuras 4A y 4B. Se calcularon el área bajo la curva (AUC) y la concentración sérica máxima ($C_{\text{máx}}$) en ratones que

tenían y que no tenían el tumor A375. En el primer experimento pk, $C_{\text{máx}}$ y AUC fueron muy similares en los ratones que no tenían tumor para AB160 y ABX (63,3+/-39,4 contra 65,5+/-14,4 y 129 contra 133 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Sin embargo, en los ratones que tenían tumor, la $C_{\text{máx}}$ y AUC para los grupos de tratamiento fueron diferentes (55,7+/-21,2 contra 63,3+/-17,3 y 112 contra 128 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) (figura 4C). Aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, coincide con el direccionamiento superior por AB160, con respecto a ABX.

Se realizó un segundo experimento pk con puntos temporales tempranos adicionales y tamaños de tumor grandes contra pequeños (figuras 4D-4F). Los resultados de este experimento demostraron AUC inferiores en los ratones que tenían el tumor con respecto a los ratones que no tenían tumor, con los valores en sangre más bajos de paclitaxel en los ratones con tumores grandes con respecto a los ratones con tumores pequeños (80,4+/- 2,7, 48,4+/-12,3 y 30,7+/-5,2 para ratones sin tumor, con tumor pequeño y con tumor grande tratados con ABX, respectivamente; 66,1+/-19,8, 44,4+/-12,1 y 22,8+/-6,9 para los tratados con AB160). De modo similar, la $C_{\text{máx}}$ cayó en ambos grupos de tratamiento en los ratones con tumores más grandes (47,2, 28,9 y 19,7 $\mu\text{g/ml}$ para ABX y 40,1, 26,9 y 15,3 $\mu\text{g/ml}$ para AB160) (figura 4G). El AUC y la $C_{\text{máx}}$ de paclitaxel

en sangre fueron inferiores en los ratones tratados con AB160 con respecto a los ratones tratados con ABX. Si bien no son estadísticamente significativos, estos datos coinciden adicionalmente con un mayor depósito de paclitaxel en los
5 tumores tratados con AB160.

Para evaluar directamente esta hipótesis, se midieron las concentraciones de paclitaxel en tumor mediante LC-MS. La concentración de paclitaxel en tumor fue significativamente mayor en los tumores tratados con AB160 con respecto a ABX en
10 los puntos temporales de 4 horas (3473 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido $\pm$ 340 contra 2127 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido $\pm$ 3,5; $p=0,02$) y 8 horas (3005 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido $\pm$ 146 contra 1688 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido $\pm$ 146; $p=0,01$), lo que sugiere que el paclitaxel permanece en el tumor por más tiempo cuando es abordado por el anticuerpo
15 (figura 4H). Esto explica la pk de la sangre y coincide con la redistribución del fármaco a los tejidos, incluido el tumor.

Las imágenes *in vivo* de AB160 etiquetado con I-125 (Abx-AvtI125) y ABX unido al isotipo de IgG (Abx-IgGI125)
20 confirmaron los resultados de LC-MS con mayores niveles de I-125 en el tumor de ratones tratados con AB160 con respecto a IgG-ABX a las 3 horas (32,2 uCi/g $\pm$ 9,1 contra 18,5 uCi/g $\pm$ 1,65; $p=0,06$) y 10 horas (41,5 uCi/g $\pm$ 6,4 contra 28,7 uCi/g $\pm$ 2,66; $p=0,03$) después de la inyección (figuras 4I y

4J). En conjunto, estos datos demuestran que la unión de BEV a ABX altera la pk de la sangre y esta alteración se debe a una redistribución del fármaco al tejido tumoral como lo muestra LC-MS de paclitaxel y el etiquetado de I-125 de BEV con respecto a un IgG1 coincidente con el isotipo.

Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que mediante la unión de un anticuerpo dirigido a tumor con ABX, la pk se altera más drásticamente que con ABX solo, disminuye la C_{max} y el AUC en la sangre debido a la redistribución de AB160 al tejido tumoral. Estos resultados de pk de paclitaxel en sangre de ratón, niveles de tejido tumoral de paclitaxel y niveles de radiactividad I-125 en ratones tratados con AB160 con respecto a ABX solo sugieren que el direccionamiento de anticuerpo de ABX altera la biodistribución de paclitaxel de modo que mayores niveles alcanzan el tumor y quedan allí por una mayor período, lo que provoca mayor regresión del tumor.

Ejemplo 7: unión de otros anticuerpos terapéuticos

Se evaluó la unión del anticuerpo CD20 antihumano (rituxamab) y el anticuerpo receptor neu/anti-HER2 (trastuzumab) a ABX para determinar si otros anticuerpos terapéuticos de IgG también presentan unión a ABX cuando se combinan *ex vivo*.

Métodos

Se prepararon nanopartículas que contenían rituximab o trastuzumab y se evaluaron como se describió en los ejemplos

anteriores.

Resultados

El tamaño de partícula de los complejos con BEV y trastuzumab (HER) fue muy similar, con tamaños promedio en el intervalo de 0,157 a 2,166 μm (figura 2A) y de 0,148 a 2,868 μm (figura 5B), respectivamente. En cambio, las partículas formadas con rituximab se volvieron mucho más grandes con proporciones inferiores de anticuerpo:ABX, con tamaños de partícula que oscilan entre 0,159 y 8,286 μm (figura 5A).

Se determinaron las afinidades de unión de rituximab y trastuzumab con ABX mediante BLItz con pH variable. Ambos anticuerpos se unen con afinidad relativamente alta en el intervalo picomolar (figura 5C). La afinidad de rituximab hacia ABX disminuyó con el aumento del pH, pero la afinidad de trastuzumab hacia ABX no se vio afectada por el pH (figura 5C).

Se evaluó la eficacia de la partícula de 160 nm hecha con rituximab (AR160) *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, se trató la línea celular de linfoma de células B Daudi con AR160, ABX o rituximab solo con concentraciones crecientes (0 a 200 $\mu\text{g/ml}$) de paclitaxel. AR160 ($\text{IC}_{50}=10 \mu\text{g/ml}$) inhibió significativamente la proliferación de células Daudi tratadas durante 24 horas ($p=0,024$) en comparación con ABX ($\text{IC}_{50}>200\mu\text{g/ml}$) o rituximab ($\text{IC}_{50}>200\mu\text{g/ml}$) solo (figura 6A).

In vivo, se estableció un modelo de xenotrasplante de células Daudi en ratones lampiños atímicos. Una vez que se establecieron los tumores, se trataron los ratones con PBS, ABX, rituximab, ABX y rituximab proporcionado secuencialmente o AR160. En el día 7 después del tratamiento, se midieron los tumores y se calculó el cambio porcentual en el tamaño del tumor desde el inicio. Los tumores tratados con AR160 presentaron regresión o permanecieron estables, mientras que los tumores en los otros grupos de tratamiento avanzaron (figura 6B). El cambio porcentual desde el inicio del tamaño del tumor en el grupo de AR160 comparado con todos los otros grupos fue significativo ($p < 0,0001$). Los ratones tratados con AR160 presentaron una supervivencia mediana significativamente mayor de más de 60 días en comparación con los 12, 16 y 12 días para los ratones tratados con PBS ($p < 0,0001$), ABX ($p < 0,0001$) o rituximab ($p = 0,0002$), respectivamente (figura 6C). Sin embargo, la diferencia en la supervivencia mediana no fue significativa entre AR160 y los grupos tratados secuencialmente ($p = 0,36$). Esto se puede deber a que el rituximab se une a las células tumorales y permanece sobre la superficie celular, lo que permite que el ABX administrado posteriormente se una al anticuerpo cuando ingresa al sitio del tumor, a diferencia de BEV que se une a una diana soluble y no a un marcador de superficie celular.

Ejemplo 8: unión de otros fármacos de quimioterapia a AB160

Se evaluó la eficacia de otros fármacos quimioterapéuticos para formar nanopartículas funcionales.

Métodos

- 5 Se prepararon nanopartículas que contenían cisplatino y se evaluaron como se describió en los ejemplos anteriores.

Resultados

Para evaluar si otro fármaco de quimioterapia se podía unir a las partículas de AB160, se coincubaron cisplatino y ABX y la
10 cantidad de cisplatino libre que queda en el sobrenadante se midió mediante HPLC. Aproximadamente el 60 % (es decir, solo el 40 % permanece en el sobrenadante) del cisplatino unido a ABX (figura 7A).

A continuación, se evaluó la toxicidad del tumor de AC con
15 respecto a ABX y cisplatino solo utilizando células A375. Se centrifugaron los complejos para retirar cisplatino no unido altamente tóxico y se reconstituyeron en medio para garantizar que cualquier toxicidad adicional de AC con respecto a ABX se deba solo al cisplatino unido a ABX. Por
20 paridad, el ABX solo se centrifugó de forma similar. AC ($IC_{50}=90 \mu\text{g/ml}$) inhibió la proliferación de las células A375 en mayor medida que el ABX solo ($IC_{50}>1000 \mu\text{g/ml}$) (figura 7B). La menor toxicidad en este experimento con respecto a otros experimentos de toxicidad se debe a algo de pérdida del

fármaco en la etapa de centrifugación, pero la comparación de ABX con AC sigue siendo pertinente.

Para determinar la toxicidad tumoral de los complejos de AB160 que contienen cisplatino, se coincubó AB160 con
5 cisplatino para formar partículas que contienen cisplatino (complejo de ABC). Se evaluó el complejo de ABC en el modelo de xenotrasplante de melanoma de A375 con respecto a cada fármaco solo y AB160. Los tumores tratados con AB160, AB160 + cisplatino administrado secuencialmente y el complejo de ABC
10 mostraron regresión en el tamaño del tumor 7 días después del tratamiento (figura 7C), pero el complejo de ABC confirió la mayor supervivencia mediana (35 días, con respecto a AB160 y AB160 + cisplatino a los 24 y 26 días, respectivamente). Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa
15 ($p = 0,82$ y $0,79$) (figura 7D), los datos coinciden con los beneficios del complejo de ABC para las tasas de supervivencia a largo plazo.

Estos datos demostraron que la parte de albúmina de ABX proporciona una plataforma para otros anticuerpos
20 terapéuticos para unir, como rituximab y trastuzumab, así como otros agentes de quimioterapia (p. ej., cisplatino), que presentaron eficacia *in vitro* e *in vivo* similar a AB160.

En conjunto, estos datos demuestran una forma sencilla de construir un conjugado nanoinmunitario versátil, lo que

permite que múltiples proteínas o agentes citotóxicos se unan a un andamiaje de albúmina único. La eficacia mejorada del fármaco dirigido con respecto a los agentes únicos solos se demostró en el modelo de ratón y se debe, al menos en parte, a una pk alterada del fármaco dirigido al anticuerpo. Además, sin pretender limitarse por la teoría, se cree que la versatilidad del conjugado nanoinmunitario descrito en la presente que no requiere un enlazador o interiorización de célula diana superará los obstáculos que tienen otras nanomedicinas para traducir los resultados de los ratones a los seres humanos.

Ejemplo 9: liofilización de AB160

Se sintetizó AB160 mediante el añadido de 8 mg (320 µl) de bevacizumab a 20 mg de Abraxane. Se añadió 1,66 ml de solución salina al 0,9 % hasta un volumen final de 2 ml y una concentración final de 4 mg/ml de bevacizumab y 10 mg/ml de Abraxane y se dejó que la mezcla se incubara a temperatura ambiente durante 30 minutos en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml.

Después de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, se diluyó la mezcla 1:2 en solución salina al 0,9 % hasta 2 mg/ml y 5 mg/ml de bevacizumab y Abraxane, respectivamente. Estas son las concentraciones de los 2 fármacos preparadas por la farmacia para la administración a

pacientes.

Se dividió AB160 en veinte alícuotas de 200 µl en tubos Eppendorf de polipropileno de 1,5 ml y congelados a -80 °C.

Una vez congelados, se liofilizaron las alícuotas durante la
5 noche con el liofilizador de mesa de 3L Virtis (SP Scientific, Warmister, PA) con la refrigeración encendida. Se generó una preparación liofilizada.

Se almacenaron las alícuotas secas a temperatura ambiente en los mismos tubos de polipropileno Eppendorf de 1,5 ml. Estas
10 muestras se reconstituyeron fácilmente en solución salina a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de centrifugado durante 7 minutos a 2000x g. Se resuspendió la muestra resultante en el amortiguador adecuado, según fue necesario.

15 Mediante comparación, una muestra que se secó con calor y vacío de velocidad fue imposible de reconstituir.

Ejemplo 10: prueba de preparaciones liofilizadas

Se reconstituyeron las muestras en diferentes puntos temporales después de la liofilización y se evaluaron en
20 cuanto a sus propiedades físicas contra ABX y AB160 recién preparados.

Se evaluó la distribución de tamaño de partícula según se describió arriba.

Se evaluó la unión de VEGF mediante incubación de la muestra

con VEGF durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó a 2000 x g durante 7 minutos. Se midió la cantidad de VEGF unido al sedimento (correspondiente a las nanopartículas) o restante en el sobrenadante con ELISA.

- 5 Se evaluó la actividad de Paclitaxel mediante citotoxicidad contra las células A375 *in vitro*.

Sorprendentemente, la liofilización no afectó significativamente el tamaño de partícula, la unión de VEGF o la actividad de paclitaxel según lo muestra la capacidad de
10 inhibir la proliferación de células de cáncer. Este resultado se mantuvo para las muestras liofilizadas almacenadas durante 1 mes (figuras 8A-8C) o 10 meses (figuras 8D-8F).

Además, resulta sorprendente que estos resultados se observaron con nanopartículas liofilizadas sin utilizar
15 crioprotectores u otros agentes que pueden afectar negativamente el uso terapéutico humano.

Ejemplo 11: eficacia de AB160 en seres humanos

Se evaluó AB160 en un ensayo clínico de fase 1 realizado por primera vez en seres humanos que estudiaba la seguridad de
20 AB160 administrado en pacientes con melanoma maligno metastásico que no han respondido a otras terapias. El estudio utiliza un diseño de ensayo clínico de fase 1 clásico 3+3 que prueba 3 dosis diferentes de AB160 en el siguiente esquema:

Tabla 4

Nivel de dosis	AB-complejo ambos fármacos DEBEN reducirse	
	Dosis de ABX	Dosis de BEV complementario
3	175 mg/m ²	70 mg/m ²
2	150 mg/m ²	60 mg/m ²
1*	125 mg/m ²	50 mg/m ²
-1	100 mg/m ²	40 mg/m ²
-2	75 mg/m ²	30 mg/m ²

*El nivel de dosis 1 se refiere a la dosis inicial.

Se seleccionaron dosis según las dosis de Abraxane utilizadas simultáneamente en la práctica clínica. AB160 se realizó
5 antes de cada dosis de tratamiento. Los tratamientos se administraron como una infusión intravenosa de 30 minutos en los días 1, 8 y 15 de un ciclo de tratamiento de 28 días. Se continuó con los tratamientos hasta llegar a una toxicidad intolerable, avance del tumor o negación del paciente. Antes
10 de cada ciclo de tratamiento, se evaluaron los pacientes en cuanto a la toxicidad; se realizaron evaluaciones del tumor cada dos ciclos (RECIST).

El estudio estuvo acompañado por estudios farmacocinéticos formales (en el paciente) asociados con la dosis 1 de los
15 ciclos 1 y 2 de la terapia.

Cinco pacientes recibieron AB160 a 100 mg/m² de ABX y 40 mg/m² de BEV, de los cuales cuatro fueron analizados.

Tabla 5: curso de la enfermedad en estudio de fase I

Curso de la enfermedad: Nivel de dosis 100 mg/m ²					
Pacien te	cantida d de ciclos	respuest a	Tiempo de PFS	fuera, motivos del tratamient o	tiempo de seguimiento
1	8	estable	238	fuera, avance	444+
2	6	estable	400+	fuera, toxicidad	400+
3	1	---	182+	fuera, toxicidad	182+
4	6	estable	181	fuera, avance	203+

5 PFS se refiere a la mediana de supervivencia sin evolución, es decir, la cantidad de días de tratamiento antes del resurgimiento del cáncer. Los eventos adversos se enumeran abajo. No hubo toxicidad limitante de la dosis (DLT), es decir, los eventos adversos no estuvieron relacionados con la

10 dosis de AB160. Se proporcionan más datos en la tabla 6

Tabla 6: eventos adversos en estudio de fase I

paciente	toxicidad	DLT
1	linfopenia grado 2	NO
2	neutropenia y leucopenia grado 3 hipertensión y anemia grado 2	NO
3	perforación colónica, fatiga y sangre grado 2 aumento de la bilirrubina	NO
4	neutropenia grado 2	NO

TABLA 7 Curso del tratamiento: Nivel de dosis 100 mg/m ²								
paciente	cantidad de ciclos administrados	cantidad de ciclos con día 15 omitido	ciclos con día 15 omitido	motivos de omisión del día 15	cantidad de reducciones de dosis	ciclos con reducción de dosis	motivo para las reducciones de dosis	estado
1	8	0			1	4	neuropatía sensorial grado 2	fuera, avance
2	6	3	1,2,4	neutropenia y leucopenia grado 3- los 3 ciclos	2	3, 5	ciclo 3: neutropenia y leucopenia grado 3 ciclo 5: neutropenia, leucopenia y fatiga grado 3 y neuropatía sensorial grado 2	fuera, toxicidad neuropatía sensorial grado 2 persistente
3	1							fuera, toxicidad perforación colónica a grado 2
4	6				2	3, 5	neuropatía sensorial grado 2-ambos ciclos	fuera, avance

El PFS promedio fue 7,6 meses y la mediana fue 7,0 meses.

Comparación con otros ensayos clínicos

La siguiente tabla muestra otros estudios clínicos publicados para la terapia de taxano contra el melanoma metastásico.

Tabla 8: terapia de taxano contra el melanoma metastásico				
Estudio o autor	N	Regímenes Rx	SSE	OS
<i>Hauschild</i>	135	C = AUC 6 (q21) P = 225 mg/m ² ; D1 (q21)	4,5	10,5
<i>Flaherty</i>	411	C = AUC 6 (q21) P = 225 mg/m ² ; D1 (q21)	4,9	11,3
<i>N057E</i>	41 35	C = AUC2 ; D1, 8 15 (q28) A = 100 mg/m ² ; D1, 8, 15 (q28)	4,5 4,1	11,1 10,9
<i>N047A</i>	53	C = AUC 6; D1 (q28) P = 80 mg/m ² ; D1, 8, 15 (q28) B = 10 mg/kg; D1,15 (q28)	6,0	12,0
<i>BEAM</i>	71	C = AUC 5; D1 (q21) P = 175 mg/m ² ; D1 (q21)	4,2	8,6
	143	C = AUC5; D1 (q21) P = 175 mg/m ² ; D1 (q21) B = 15 mg/kg; D1 (q21)	5,6	12,3
<i>N0775</i>	51	C = AUC6 (5) ; D1 (q28) A = 100 (80) mg/m ² ; D1, 8, 15 (q28) B = 10 mg/kg; D1, 15 (q28)	6,2	13,9
<i>Spitler</i>	50	A = 150 mg/m ² ; D1, 8, 15 (q28) B = 10 mg/kg; D1, 15 (q28)	7,6	15,6
C=carboplatino, P=paclitaxel, A=nab-paclitaxel, B=bevacizumab				
Referencias: Hauschild: Hauschild et al., (2009) <i>J Clin Oncol.</i> 27(17):2823-30 Flaherty: Flaherty et al., (2010) <i>J Clin Oncol.</i> 28:15s (supl.; resumen 8511) N057E: Kottschade et al., (2010) <i>Cancer</i> 117(8):1704-10 N057A: Perez et al., (2009) <i>Cancer</i> 115(1):119-27 BEAM: Kim et al., (2012) <i>J Clin Oncol.</i> 30(1):34-41 N0775: Kottschade et al., (2013) <i>Cancer</i> 119(3):586-92 Spitler: Boasberg et al., (2011) <i>J Clin Oncol.</i> 29 (supl.; resumen 8543)				

En el ensayo actual, la administración de las partículas de AB160 es equivalente a una dosis de 100 mg/m² de abraxane y 40 mg/m² de bevacizumab. El único estudio que empleó BEV y ABX solo fue Spitler. Spitler, sin embargo, utilizó una dosis más alta de ABX. El presente estudio también utilizó menos

del 10 % de la dosis de BEV informada en estudios anteriores, si las dosis se ajustan para el paciente promedio (se supone que tienen un área superficial de 1,9 m² y una masa de 90 kg).

5 Spilter también evaluó pacientes que no se habían tratado anteriormente, mientras que el estudio actual analizó pacientes que no habían tenido éxito con los tratamientos anteriores. La ineficacia de un tratamiento anterior no solo consume tiempo de la PFS esperada, sino que selecciona
10 células de cáncer que son más resistentes al tratamiento y, típicamente, deja al paciente en una peor condición física. Por ende, la PFS para una población de pacientes con una terapia de "rescate" (según se utiliza en la presente, con AB160) se espera que tenga una PFS inferior que una población
15 sin tratamiento previo. Esto se puede observar en un ensayo clínico de fase 2 (Herish et al., *Cancer*, enero de 2010, 116:155) que analizó pacientes de rescate y sin tratamiento previo con Abraxane solo. Para los pacientes con tratamiento anterior con Abraxane solo, la PFS fue de 3,5 meses. Herish et
20 al. *Ann. Oncol* 2015, (epub 26 de septiembre de 2015) informó una PFS de 4,8 meses para los pacientes sin tratamiento previo tratados con ABX solo.

Tabla 9: rendimiento de AB160 en un estudio limitado contra los datos publicados

Estudio	Tratamiento anterior	Dosis de ABX en paciente promedio (dosis relativa)	Dosis de BEV en paciente promedio (dosis relativa)	PFS (meses)
AB160	Sí	190 mg/paciente (100 mg/m ²)	76 mg/paciente (40 mg/m ²)	7,0
Spitler	No	285 mg/paciente (150 mg/m ²)	900 mg/paciente (10 mg/kg)	8,3
Hersh 2010	Sí	190 mg/paciente (100 mg/m ²)	-	3,5
Hersh 2010	No	285 mg/paciente (150 mg/m ²)	-	4,5
Hersh 2015	No	285 mg/paciente (150 mg/m ²)	-	4,8

Por ende, los resultados primarios del ensayo clínico de fase I con AB160 indican un aumento en PFS en el melanoma maligno metastásico de etapa tardía en los pacientes tratados anteriormente. Este aumento es particularmente sorprendente dado que la PFS fue mayor que las de Spitler, que no habían recibido quimioterapia y que recibieron una mayor dosis de Abraxane y una dosis casi 12 veces mayor de bevacizumab. La dosis de BEV utilizada en AB160 es mucho menor que en cualquier otro estudio, de modo que la mejor comparación no es con Spitler, sino con Hersh.

Por ende, el complejo de ABX/BEV (AB160) es superior a la administración secuencial de ABX y BEV o ABX solo y logra este resultado superior con una dosis eficaz muy baja de BEV. Por lo tanto, los datos coinciden con que AB160 presenta un mejor direccionamiento de los agentes quimioterapéuticos

hacia el tumor y que este direccionamiento es mediado por BEV. Es posible que la nanopartícula de ABX colabore con el direccionamiento de BEV hacia el tumor, ya que la albúmina es absorbida selectivamente por los tumores. También es posible
5 que la existencia del complejo de BEV/ABX muestre mayor estabilidad *in vivo* que el Abraxane.

Ejemplo 12: estudio de seguimiento para investigar si el pretratamiento con BEV mejora el direccionamiento

Siguiendo el protocolo general que aparece arriba, se
10 inyectaron ratones lampiños atímicos con 1×10^6 células de melanoma humano A375 en el flanco derecho y se trataron con PBS, 12 mg/kg BEV, 30 mg/kg ABX, AB160 o se pretrataron con 1,2 mg/kg BEV y 24 h más tarde, AB160. Se representan los datos en el día 7 y el día 10 después del tratamiento como
15 volumen tumoral en mm^3 . Las figuras 11A-E registran el tamaño del tumor durante 10 días. Solo los ratones tratados con AB160 (con o sin pretratamiento con BEV) mostraron una reducción en el volumen del tumor promedio. Véase también la figura 11F y la figura 11G.

20 Los datos del día 7 después del tratamiento, según se resumen en la figura 11F, muestran que el pretratamiento con BEV estaba asociado con una reducción estadísticamente significativa en el volumen del tumor sobre el control o BEV solo ($p \leq 0,0001$) o ABX solo ($p \leq 0,0001$).

Los datos del día 10 después del tratamiento, según se resumen en la figura 11G, muestran nuevamente que el pretratamiento con BEV estaba asociado con una reducción estadísticamente significativa en el volumen del tumor sobre el control o BEV solo ($p \leq 0,0001$) o ABX solo ($p \leq 0,0001$). El pretratamiento con BEV antes de AB160 también se asoció con una reducción en el volumen del tumor sobre AB160 solo ($p=0,02$), con una respuesta completa en dos ratones.

En este experimento, una dosis de 12 mg/kg de BEV no resultó terapéutica. La cantidad de BEV añadida en el grupo de pretratamiento fue de solo 1,2 mg/kg, que es 1/10 de la dosis habitual en ratones. Aun así el pretratamiento con una dosis subterapéutica parece mostrar una mayor eficacia de la nanopartícula de AB160. Estos datos apoyan la idea de que el pretratamiento con una cantidad subterapéutica de BEV puede depurar los niveles sistémicos de VEGF, dejando una mayor concentración relativa en el tumor de modo que el direccionamiento de VEGF asociado al tumor por las nanopartículas de AB160 sea más eficaz.

Ejemplo 13: medios alternativos de administrar las nanopartículas

Se considera que las nanopartículas de la presente invención se pueden administrar directamente al tumor. Por ejemplo, las nanopartículas se pueden administrar mediante una cánula

intra-arterial o mediante inyección directa en el tumor. En dichas modalidades, se considera que las nanopartículas grandes (p. ej., 580 nm o 1130 nm) se pueden administrar mediante inyección directa en un tumor o cerca de este.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de nanopartículas liofilizada que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas comprende
 - 5 a. una proteína portadora,
 - b. entre aproximadamente 100 y aproximadamente 1000 anticuerpos y
 - c. opcionalmente, al menos un agente terapéutico,en donde los anticuerpos están dispuestos en una superficie
10 externa de las nanopartículas y además en donde, tras la reconstitución con una solución acuosa, los anticuerpos conservan su asociación con la superficie externa de la nanopartícula, con la condición de que dicha composición liofilizada sea estable a entre aproximadamente 20 °C y
15 aproximadamente 25 °C durante al menos 3 meses y, además, en donde las nanopartículas son capaces de unirse a un epítopo predeterminado *in vivo*.
2. La composición de nanopartículas de la reivindicación 1 en donde cada una de las nanopartículas comprende entre
20 aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos.
3. La composición de nanopartículas liofilizadas de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el tamaño promedio de las nanopartículas es de entre 130 nm y 14.000 nm.

4. La composición de nanopartículas liofilizadas de la reivindicación 3 en donde el tamaño promedio de las nanopartículas es de entre 130 nm y 1000 nm.
5. La composición de nanopartículas liofilizadas de la
5 reivindicación 3 en donde el tamaño promedio de las nanopartículas es de entre 130 nm y 800 nm.
6. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde menos del 0,01 % de las nanopartículas en la composición tienen un
10 tamaño mayor que 800 nm.
7. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde menos del 0,01 % de las nanopartículas en la composición tienen un tamaño seleccionado del grupo que consiste en más de 200 nm,
15 más de 300 nm, más de 400 nm, más de 500 nm, más de 600 nm y más de 700 nm.
8. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el al menos un agente terapéutico está ubicado dentro de la
20 nanopartícula, dispuesto en la superficie exterior de la nanopartícula o ambos.
9. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en ado-

trastuzumab emtansina, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, denosumab, dinutuximab, ipilimumab, nivolumab, obinutuzumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, rituximab y trastuzumab.

5 10. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el al menos un agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en abiraterona, bendamustina, bortezomib, carboplatino, cabazitaxel, cisplatino, clorambucilo, 10 dasatinib, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etopósido, everolimus, gefitinib, idarubicina, imatinib, hidroxiurea, imatinib, lapatinib, leuprorelina, melfalán, metotrexato, mitoxantrona, nedaplatino, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, pazopanib, pemetrexed, picoplatino, 15 romidepsina, satraplatino, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, tenipósido, triplatino, vinblastina, vinorelbina, vincristina y ciclofosfamida.

11. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la 20 proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en gelatina de albúmina, elastina, gliadina, legúmina, zeína, una proteína de soja, una proteína de leche y una proteína de suero.

12. La composición de nanopartículas liofilizadas de

cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la albúmina es albúmina de suero humano.

13. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los anticuerpos están dispuestos en una capa sustancialmente simple de anticuerpos en toda o en parte de la superficie de la nanopartícula.

14. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los anticuerpos, la proteína portadora y, cuando está presente, el agente terapéutico, se unen a través de enlaces no covalentes.

15. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la composición se formula para administración intravenosa.

16. La composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el tamaño de nanopartícula promedio en la composición es de entre más de 800 nm y aproximadamente 3,5 μm .

17. La composición de nanopartículas liofilizadas de la reivindicación 16 en donde la composición se formula para inyección directa o perfusión en un tumor.

18. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde las nanopartículas

tienen una constante de disociación de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 1×10^{-9} M.

19. Un método para fabricar la composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones anteriores

5 en donde dicho método comprende

a. poner en contacto la proteína portadora y opcionalmente el al menos un agente terapéutico con los anticuerpos en una solución que tiene un pH de 5,0 o mayor y una temperatura de entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 60°C para

10 generar una nanopartícula; y

b. liofilizar la nanopartícula.

20. El método de la reivindicación 19 en donde la temperatura es de entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 60°C .

15 21. Una composición de nanopartículas liofilizada que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas comprende:

a. un núcleo de paclitaxel unido a albúmina y

b. entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800

20 moléculas de bevacizumab dispuestas en una superficie del núcleo de paclitaxel unido a albúmina de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie,

en donde los anticuerpos mantienen su asociación con la

superficie de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa, siempre que dicha composición liofilizada sea estable entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C durante al menos 3 meses y las nanopartículas reconstituidas sean capaces de unirse a VEGF *in vivo*.

22. Una composición de nanopartículas liofilizada que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas comprende:
- a. un núcleo de paclitaxel unido a albúmina y
 - 10 b. una cantidad de bevacizumab dispuesta en una superficie del núcleo de paclitaxel unido a albúmina de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie,
- en donde los anticuerpos mantienen su asociación con la superficie de la nanopartícula tras la reconstitución con una solución acuosa, siempre que dicha composición liofilizada sea estable entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C durante al menos 3 meses y las nanopartículas reconstituidas sean capaces de unirse a VEGF *in vivo*, y en
- 15 donde además el tamaño de nanopartícula reconstituida promedio es entre mayor que 800 nm y aproximadamente 3,5 µm.

23. La composición de nanopartículas de la reivindicación 21 en donde la proporción en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab es de entre aproximadamente 5:1 y

aproximadamente 1:1.

24. La composición de nanopartículas de la reivindicación 23 en donde la proporción en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab es de aproximadamente 10:4.

5 25. La composición de nanopartículas de la reivindicación 22 en donde la proporción en peso de paclitaxel unido a albúmina a bevacizumab es entre mayor que 1:1 y aproximadamente 1:3.

26. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 21, 23 o 24 en donde el bevacizumab es una
10 capa sustancialmente simple de anticuerpos en toda o en parte de la superficie de la nanopartícula.

27. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 21-26 en donde el bevacizumab está unido al núcleo mediante enlaces no covalentes.

15 28. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 21-27 en donde la albúmina es albúmina de suero humano.

29. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 21-28 en donde menos del 0,01 % de las
20 nanopartículas en la composición tienen un tamaño seleccionado del grupo que consiste en más de 200 nm, más de 300 nm, más de 400 nm, más de 500 nm, más de 600 nm, más de 700 nm y más de 800 nm.

30. La composición de nanopartículas de la reivindicación 29

en donde la composición se formula para administración intravenosa.

31. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 21-29 en donde la composición se formula
5 para inyección directa o perfusión en un tumor.

32. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 21-31 en donde la nanopartícula además comprende al menos un agente terapéutico adicional que no es paclitaxel o bevacizumab.

10 33. La composición de nanopartículas de la reivindicación 32 en donde el al menos un agente terapéutico adicional está dispuesto en la superficie exterior de la nanopartícula.

34. La composición de nanopartículas de la reivindicación 32 o 33 en donde el al menos un agente terapéutico adicional se
15 selecciona del grupo que consiste en abiraterona, bendamustina, bortezomib, carboplatino, cabazitaxel, cisplatino, clorambucilo, dasatinib, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etopósido, everolimus, gemcitabina, gefitinib, idarubicina, imatinib, hidroxiurea, imatinib,
20 lapatinib, leuprorelina, melfalán, metotrexato, mitoxantrona, nedaplatino, nilotinib, oxaliplatino, pazopanib, pemetrexed, picoplatino, romidepsina, satraplatino, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, tenipósido, triplatino, vinblastina, vinorelbina, vincristina y ciclofosfamida.

35. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 21-34 en donde las nanopartículas tienen una constante de disociación de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 1×10^{-9} M.

5 36. Un método para fabricar la composición de nanopartículas liofilizadas de cualquiera de las reivindicaciones 21-35 en donde dicho método comprende poner en contacto la albúmina y el paclitaxel con el bevacizumab en una solución que tiene un pH de entre 5,0 y 7,5 y una temperatura de entre
10 aproximadamente 23 °C y aproximadamente 60 °C para formar una composición de nanopartículas y liofilizar la composición de nanopartículas.

37. El método de la reivindicación 36 en donde la temperatura es de entre aproximadamente 55 °C y
15 aproximadamente 60 °C.

38. Un método para tratar una célula de cáncer, el cual método comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de la composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-18 o 21-35 para tratar la célula de
20 cáncer.

39. Un método para tratar un tumor en un paciente que lo necesita, el cual método comprende administrarle al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-18 o

21-35 para tratar el tumor.

40. El método de la reivindicación 39 en donde el tamaño del tumor se reduce.

41. El método de la reivindicación 39 en donde la
5 composición de nanopartículas se administra por vía intravenosa.

42. El método de la reivindicación 39 en donde la composición de nanopartículas se administra por inyección directa o perfusión en el tumor.

10 43. El método de cualquiera de la reivindicaciones 39-42 que comprende:

a. administrar la composición de nanopartícula una vez por semana durante tres semanas;

b. detener la administración de la composición de
15 nanopartícula durante una semana; y

c. repetir las etapas a) y b) según sea necesario para tratar el tumor.

44. El método de cualquiera de la reivindicaciones 39-43 en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre
20 aproximadamente 75 mg/m² y aproximadamente 175 mg/m² de paclitaxel.

45. El método de cualquiera de la reivindicaciones 39-44 en donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 30 mg/m² y aproximadamente 70 mg/m² de

bevacizumab.

46. Una composición de nanopartículas que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas comprende:

- 5 a. una proteína portadora,
- b. entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos y
- c. opcionalmente al menos un agente terapéutico que no es paclitaxel,

10 en donde los anticuerpos están dispuestos en una superficie de las nanopartículas de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie y en donde las nanopartículas pueden unirse a un epítipo predeterminado *in vivo*.

15 47. Una composición de nanopartículas que comprende nanopartículas, en donde cada una de las nanopartículas comprende:

- a. una proteína portadora que no es albúmina,
- b. entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 anticuerpos y

20 c. opcionalmente, al menos un agente terapéutico,
en donde los anticuerpos están dispuestos en una superficie de las nanopartículas de tal manera que la porción de unión del anticuerpo se dirige hacia afuera desde esa superficie y

en donde las nanopartículas pueden unirse a un epítopo predeterminado *in vivo*.

48. La composición de nanopartículas de la reivindicación 46 o 47 en donde menos del 0,01 % de las nanopartículas en la
5 composición tienen un tamaño mayor que 800 nm.

49. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-48 en donde menos del 0,01 % de las nanopartículas en la composición tienen un tamaño seleccionado del grupo que consiste en más de 400 nm, más de
10 500 nm, más de 600 nm y más de 700 nm.

50. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-49 en donde el al menos un agente terapéutico está ubicado dentro de la nanopartícula.

51. La composición de nanopartículas de cualquiera de las
15 reivindicaciones 46-50 en donde el al menos un agente terapéutico está ubicado en la superficie exterior de la nanopartícula.

52. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-51 en donde el al menos un agente
20 terapéutico está ubicado dentro de la nanopartícula y en la superficie exterior de la nanopartícula.

53. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-52 en donde las composiciones de nanopartículas comprenden entre aproximadamente 400 y

aproximadamente 800 anticuerpos.

54. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-53 en donde los anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en ado-trastuzumab
5 emtansina, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, denosumab, dinutuximab, ipilimumab, nivolumab, obinutuzumab, ofatumumab, panitumumab, pembrolizumab, pertuzumab, rituximab y trastuzumab.

55. La composición de nanopartículas de cualquiera de las
10 reivindicaciones 46-54 en donde el al menos un agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en abiraterona, bendamustina, bortezomib, carboplatino, cabazitaxel, cisplatino, clorambucilo, dasatinib, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, erlotinib, etopósido, everolimus,
15 gefitinib, idarubicina, imatinib, hidroxiurea, imatinib, lapatinib, leuprorelina, melfalán, metotrexato, mitoxantrona, nedaplatino, nilotinib, oxaliplatino, paclitaxel, pazopanib, pemetrexed, picoplatino, romidepsina, satraplatino, sorafenib, vemurafenib, sunitinib, tenipósido, triplatino,
20 vinblastina, vinorelbina, vincristina y ciclofosfamida.

56. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-55 en donde los anticuerpos son una capa sustancialmente simple de anticuerpos en toda o en parte de la superficie de la nanopartícula.

57. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-56 en donde los anticuerpos, la proteína portadora y, cuando está presente, el agente terapéutico, se unen a través de enlaces no covalentes.
- 5 58. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-57 en donde la proteína portadora se selecciona del grupo que consiste en gelatina, elastina, gliadina, legúmina, zeína, una proteína de soja, una proteína de leche y una proteína de suero.
- 10 59. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46 o 48-57 en donde la proteína portadora es albúmina.
60. La composición de nanopartículas de la reivindicación 59 en donde la albúmina es albúmina de suero humano.
- 15 61. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-60 en donde la composición se formula para administración intravenosa.
62. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-61 en donde el tamaño de nanopartícula promedio en la composición es de entre más de 800 nm y
- 20 aproximadamente 3,5 μm .
63. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-62 en donde la composición se formula para inyección directa o perfusión en un tumor.

64. La composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-63 en donde las nanopartículas tienen una constante de disociación de entre aproximadamente 1×10^{-11} M y aproximadamente 1×10^{-9} M.

5 65. Un método para producir la composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-64 en donde dicho método comprende poner en contacto la proteína portadora y opcionalmente al menos un agente terapéutico con los anticuerpos en una solución que tiene un pH de entre 5,0 y
10 7,5 y una temperatura de entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 60 °C.

66. El método de la reivindicación 65 en donde la temperatura es de entre aproximadamente 23 °C y aproximadamente 60 °C.

15 67. El método de la reivindicación 65 en donde la temperatura es de entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 60 °C.

68. Un método para producir la composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-64 en donde dicho
20 método comprende (a) poner en contacto la proteína portadora y opcionalmente el al menos un agente terapéutico para formar un núcleo y (b) poner en contacto el núcleo con los anticuerpos en una solución que tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,5 a una temperatura

de entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 60 °C.

69. El método de la reivindicación 68 en donde la temperatura es de entre aproximadamente 23 °C y aproximadamente 60 °C.

5 70. El método de la reivindicación 68 en donde la temperatura es de entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 60 °C.

71. Un método para tratar una célula de cáncer, el cual método comprende poner en contacto la célula con una cantidad
10 eficaz de la composición de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-64 para tratar la célula de cáncer.

72. Un método para tratar un tumor en un paciente que lo necesita, el cual método comprende administrarle al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de
15 nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 46-64 para tratar el tumor.

73. El método de la reivindicación 72 en donde el tamaño del tumor se reduce.

74. El método de la reivindicación 72 o 73 en donde la
20 composición de nanopartículas se administra por vía intravenosa.

75. El método de la reivindicación 72 o 73 en donde la composición de nanopartículas se administra por inyección directa o perfusión en el tumor.

76. El método de cualquiera de la reivindicaciones 65-75 que comprende:

- a. administrar la composición de nanopartícula una vez por semana durante tres semanas;
- 5 b. detener la administración de la composición de nanopartícula durante una semana; y
- c. repetir las etapas a) y b) según sea necesario para tratar el tumor.

77. El método de cualquiera de la reivindicaciones 65-76 en
10 donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre aproximadamente 75 mg/m² y aproximadamente 175 mg/m² de la proteína portadora.

78. El método de cualquiera de la reivindicaciones 65-77 en
donde la cantidad terapéuticamente eficaz comprende entre
15 aproximadamente 30 mg/m² y aproximadamente 70 mg/m² del anticuerpo.

79. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende la administración del anticuerpo libre al paciente 12-48 horas antes de la
20 administración de la nanopartícula, en donde el anticuerpo libre se une a la misma diana que el anticuerpo en la nanopartícula.

80. El método de la reivindicación 79 en donde el anticuerpo libre se administra en una dosis inferior a la mitad de la

dosis terapéutica.

81. El método de la reivindicación 79 en donde el anticuerpo es BEV y BEV se administra a 1 mg/kg, 24 horas antes de la administración de AB160.